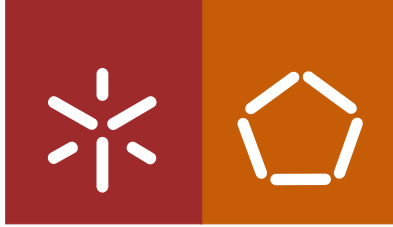


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

António Rafael Esteves Sousa

## **Estudo do Impacto de Variáveis de Processo nos Parâmetros de Qualidade da Cerveja Artesanal ao Longo do Tempo de Prateleira**

outubro de 2014



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

António Rafael Esteves Sousa

**Estudo do Impacto de Variáveis de Processo  
nos Parâmetros de Qualidade da Cerveja  
Artesanal ao Longo do Tempo de Prateleira**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica  
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Lucília Domingues**  
e dos  
**Engenheiro Francisco Pereira**  
**Engenheiro Filipe Macieira**

outubro de 2014



Universidade do Minho  
Escola de Engenharia

### Declaração RepositóriUM: Dissertação de Mestrado

Nome: António Rafael Esteves Sousa

N.º do Cartão de Cidadão: 13939282 Telefone/Telemóvel: 916402630

Correio eletrónico: toneesousa@msn.com

Curso: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica Ano de conclusão da dissertação: 2014

Área de Especialização: Tecnologia Química e Alimentar

Escola de Engenharia, Departamento/Centro: Engenharia Biológica

### TÍTULO DA DISSERTAÇÃO/TRABALHO DE PROJETO

Título em PT: Estudo do impacto de variáveis de procesos nos parâmetros de qualidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira

Título em EN: Study of processing variables impact on craft beer quality parameters during shelf-life.

Orientador: Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues

Coorientador: Luciano Francisco Pereira

Número de Unidades ECTS da Dissertação: 30 Classificação em valores (0 a 20): \_\_\_\_\_

Classificação ECTS com base no percentil (A a F): \_\_\_\_\_

Declaro sob compromisso de honra que a dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Universidade do Minho, UM.

Declaro que concedo à Universidade do Minho e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha dissertação, em suporte digital.

Concordo que a minha dissertação seja colocada no repositório da Universidade do Minho com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☐ Disponibilização imediata do trabalho para acesso universal;
2. ☒ Disponibilização do trabalho para acesso exclusivo na UM, durante o período de  
☐ 1 ano, ☐ 2 anos ou ☒ 3 anos, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso universal.
3. ☐ Disponibilização do trabalho de acordo com o **Despacho RT-98/2010 c)**

Braga, 31 de Outubro de 2014

Assinatura:

\_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Ao longo deste percurso, várias pessoas contribuíram de forma positiva, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e a elas devo o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Lucília Domingues, minha orientadora, agradeço a confiança depositada para a realização deste trabalho.

Aos Engenheiros Francisco Pereira e Filipe Macieira, meus co-orientadores da empresa FermentUM, agradeço toda a coordenação, ajuda, acompanhamento científico e intelectual e cedência do material necessário durante a realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Eduardo Coelho, pelo seu companheirismo e acompanhamento científico disponibilizado ao longo da realização deste trabalho.

Ao Sr. Américo, ao Tiago e ao Luís, colegas de trabalho da empresa, agradeço a camaradagem e o ótimo ambiente de trabalho que me proporcionaram ao longo destes meses.

Ao meu grupo de amigos mais íntimos que sempre me apoiaram ao longo destes anos de curso.

À Ana Luísa, por toda a amizade e apoio concedido ao longo destes anos académicos e pela motivação, força e confiança que me proporcionou ao longo destes meses de trabalho.

Aos meus pais e irmão, o mais sincero agradecimento, por todo o apoio, amizade e amor proporcionado ao longo da minha vida.



## Sumário

Em Portugal, a procura de cerveja artesanal tem aumentado consideravelmente, perspetivando-se a sua afirmação e expansão no mercado de bebidas alcoólicas. De um modo geral, estas cervejas não são filtradas nem pasteurizadas. Estes fatores contribuem para o baixo tempo de prateleira, situando-se em geral entre os 4 e os 8 meses. Assim, o objetivo deste trabalho centra-se na identificação das principais variáveis que influenciam positiva e/ou negativamente, o tempo de prateleira da cerveja artesanal de modo a melhorar a estabilidade sensorial deste produto e aumentar o seu tempo de prateleira.

Inicialmente, identificaram-se as variáveis a introduzir num lote de cerveja do tipo *Pilsner* e os parâmetros físico-químicos a monitorizar. As variáveis em estudo foram a concentração de levedura na garrafa, a desinfecção da garrafa, o uso de uma cola de estabilização, tipo de vidro da garrafa e temperatura de armazenamento. Os parâmetros avaliados foram: pressão interna, pH, brix, condutividade, % de sal, estabilidade da espuma, cor e turvação e quantificação de compostos maioritários e compostos minoritários presentes na cerveja. Através da elaboração dos perfis de variação de cada parâmetro ao longo do tempo avaliaram-se as alterações favoráveis, passíveis de serem introduzidas no processo cervejeiro artesanal.

Com a realização deste estudo, concluiu-se que duas variáveis estudadas apresentam um efeito negativo na estabilidade da cerveja comparativamente à amostra-padrão, enquanto uma das variáveis apresentou um efeito positivo. A variável excesso de levedura promoveu o processo de re-fermentação em garrafa, verificando-se o aumento da pressão interna ( $3,3 \pm 0,0$  bar) e da concentração de ácidos levando a um decréscimo acentuado do pH ( $3,7 \pm 0,0$ ) em relação à amostra-padrão. Também se verificou uma elevada velocidade de degradação da espuma ( $1,5 \pm 0,1$  mm/seg) com consequente diminuição da estabilidade da espuma em relação à amostra-padrão. O engarrafamento da cerveja em garrafa transparente promoveu a diminuição do pH ( $3,6 \pm 0,0$ ) e o aumento da concentração de ácidos resultantes de fenómenos de oxidação.

A garrafa armazenada a 4°C, demonstrou ser a variável para a qual a cerveja apresentou uma maior estabilidade pois apresentou o menor decréscimo do pH ( $4,0 \pm 0,0$ ) em relação a todas as outras variáveis.

**Palavras-chave:** Cerveja artesanal; tempo de prateleira; estabilidade da cerveja, caracterização da cerveja;



## Abstract

In Portugal, the demand for craft beer has increased substantially towards its statement and expansion in alcoholic beverage market. In general, these beers are not filtered or pasteurized. These factors contribute to the low beer shelf-life, standing generally between 4 and 8 months. Thus, the aim of this thesis is based on the identification of main variables that influence positively and / or negatively, the shelf-life of craft beer to enhance the flavor stability of the product and increase its shelf-life.

Initially, it was necessary identify the variables to introduce in a batch of Pilsner type beer and choose the physico-chemical parameters to be monitorized. The studied variables were the yeast concentration in the bottle, the bottle disinfection, the use of a glue stabilization, a type of glass bottle and storage temperature. The parameters evaluated were: internal pressure, pH, Brix, conductivity, salt concentration (%), foam stability, color and turbidity and quantification of major compounds and minor compounds present in beer. Through the development of variation profiles of each parameter over time, the favorable changes which could be introduced in the craft brewing process were evaluated. With this study, it was concluded that two of the studied variables showed a negative effect on beer stability comparing with standard sample, while one variable showed a positive effect. The variable “high level of yeast” promoted the re-fermentation process in the bottle with the consequent increase of internal pressure ( $3,3 \pm 0,0$  bar) and acids concentration, leading to a marked decrease of pH ( $3,7 \pm 0,0$ ) in relation to standard sample. It was also observed an high velocity foam degradation ( $1,5 \pm 0,1$  mm/seg) with consequent reduction of foam stability in relation to standard sample.

The bottling of beer in a transparent bottle promoted the decrease of pH ( $3,6 \pm 0,0$ ) and increase of acids concentration as consequence of oxidation phenomenon.

On the other hand, the bottle stored at 4 °C, proved to be the variable for which the beer showed a higher stability because it showed the lowest pH decrease ( $4,0 \pm 0,0$ ) compared to all other variables.

**Key-words:** Craft beer; shelf-life; beer stability; beer characterization;





# Índice

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos.....   | iii  |
| Sumário .....   | v    |
| Abstract.....   | vii  |
| Índice .....  | ix   |
| Índice de Figuras .....   | xi   |
| Índice de Tabelas .....   | xiii |
| 1. Introdução .....   | 1    |
| 1.1. Tecnologia de produção de cerveja .....  | 4    |
| 1.1.1. <i>Matérias-primas</i> .....   | 4    |
| 1.2. Processo cervejeiro .....  | 7    |
| 1.2.1. <i>Maltagem</i> .....  | 8    |
| 1.2.2. <i>Tecnologia da produção do mosto</i> .....   | 9    |
| 1.2.3. <i>Tecnologia do processo de fermentação</i> .....   | 14   |
| 1.2.4. <i>Processamentos finais</i> .....   | 18   |
| 1.3. Fatores que influenciam a estabilidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira..... | 19   |
| 1.3.1. <i>Temperatura</i> .....   | 20   |
| 1.3.2. <i>Garrafa de vidro</i> .....  | 20   |
| 1.3.3. <i>Colas de estabilização</i> .....  | 21   |
| 1.3.4. <i>Levedura</i> .....  | 22   |
| 1.3.5. <i>Higienização</i> .....  | 24   |
| 2. Enquadramento do trabalho na empresa de acolhimento.....   | 29   |
| 2.1. A empresa - <i>Fermentum</i> .....   | 29   |
| 2.2. O produto - Cerveja LETRA .....  | 29   |
| 3. Objetivo .....   | 31   |
| 3.1. Objetivos específicos .....  | 31   |
| 4. Materiais.....   | 33   |
| 4.1. Métodos.....   | 35   |
| 5. Apresentação e discussão dos resultados .....  | 43   |
| 5.1. Reprodutibilidade das medidas efetuadas.....   | 43   |

|   |    |
|---|----|
| 5.2. Pressão interna .....  | 45 |
| 5.3. pH .....   | 47 |
| 5.4. Brix.....  | 50 |
| 5.5. Condutividade e % de sal .....   | 51 |
| 5.6. Espuma .....   | 53 |
| 5.6.1 Velocidade de degradação da espuma .....  | 53 |
| 5.7. Cor e turvação.....  | 55 |
| 5.8. Quantificação de compostos maioritários – HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ).....              | 57 |
| 5.8.1. Ácido cítrico.....   | 58 |
| 5.8.2. Ácido acético.....   | 59 |
| 5.8.3. Ácido succínico.....   | 60 |
| 5.8.4. Ácido málico.....  | 61 |
| 5.8.5. Ácido Láctico.....   | 62 |
| 5.8.6. Etanol.....  | 63 |
| 5.8.7. Glicerol.....  | 64 |
| 5.8.8. Maltose .....  | 65 |
| 5.8.9. Glucose e frutose.....   | 67 |
| 5.9. Quantificação de compostos minoritários (voláteis) – GC – MS ( <i>Gas Chromatography-Mass Spectrography</i> )..... | 67 |
| 5.9.1. Álcoois superiores.....  | 69 |
| 5.9.2. Ésteres.....   | 71 |
| 5.9.3. Ácidos gordos.....   | 73 |
| 5.9.4. Compostos carbonilo.....   | 75 |
| 5.9.5. Álcoois monoterpénicos.....  | 77 |
| 6. Conclusões e Perspetivas futuras.....  | 79 |
| Bibliografia .....  | 83 |
| A. Anexos.....  | 96 |

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> -Esquema com diferentes estilos de cerveja de acordo com o tipo de fermentação: <i>Alé</i> ou <i>Lager</i> . Adaptado de ( <a href="https://microbrewery.wordpress.com/tag/beer-types-2/">https://microbrewery.wordpress.com/tag/beer-types-2/</a> ) .....    | 1  |
| <b>Figura 2-a)</b> Plantação de lúpulo; <b>b)</b> Lúpulo em forma de pellet .....   | 5  |
| <b>Figura 3</b> -Esquema ilustrativo do processo cervejeiro artesanal. Adaptado de (Bubacz, McCreanor et al. 2013) .....  | 7  |
| <b>Figura 4</b> - a) Infusão da cevada; b) Germinação da cevada; c) Secagem do malte; .....   | 9  |
| <b>Figura 5</b> - Diagrama de um tanque de brassagem (Bamforth, 2003) .....   | 10 |
| <b>Figura 6</b> - Diagrama de um tanque de clarificação do mosto (Bamforth, 2003) .....   | 11 |
| <b>Figura 7</b> - Representação esquemática de um fermentador cilíndrico (Bamforth, 2003) ...   | 15 |
| <b>Figura 8</b> - Perfil de assimilação de hidratos de carbono. Representação gráfica de açúcares fermentáveis durante a fermentação (Munroe, 2006) .....   | 16 |
| <b>Figura 9</b> - Representação gráfica relativo aos perfis de pH, etanol, CO <sub>2</sub> , densidade do mosto e células em suspensão ao longo da fermentação (Munroe, 2006).....  | 16 |
| <b>Figura 10</b> - Processo de fabrico cervejeiro artesanal (Retirado de <a href="http://www.cervejalettra.pt">www.cervejalettra.pt</a> ).....  | 18 |
| <b>Figura 11</b> - Composição estrutural da bentonite. Retirado de (Hosterman and Patterson 1992) .....   | 22 |
| <b>Figura 12</b> -Ilustração transversal da levedura e os seus organelos principais (Tenge, 2009)....   | 23 |
| <b>Figura 13</b> -Cervejas <i>LETRA</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 14</b> - Esquema da frequência da amostragem da experiência . Foram retiradas amostras de 15 em 15 dias (T0 a T8), para análise de todos os parâmetros. As amostras T0 e T7 foram analisadas por via HPLC e GC-MS para quantificação de compostos minoritários..... | 33 |
| <b>Figura 15</b> -Três tipos de garrafas utilizadas na experiência .....  | 35 |
| <b>Figura 16</b> -Aparelho de medição da pressão interna da garrafa .....   | 36 |
| <b>Figura 17</b> -Equipamento de medição da espuma - <i>Foam-Analyzer</i> .....   | 37 |
| <b>Figura 18</b> -Aparelho de medição do Brix .....   | 38 |
| <b>Figura 19</b> - Aparelho de medição do pH.....   | 38 |
| <b>Figura 20</b> -Aparelho de medição da condutividade e % de sal .....   | 39 |
| <b>Figura 21</b> -Espectrofotómetro da <i>AVANTES</i> .....   | 40 |
| <b>Figura 22</b> - Representação gráfica da variação da pressão interna para diferentes variáveis ao longo do tempo .....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 23-</b> Representação gráfica da variação do pH para diferentes variáveis ao longo do tempo .....   | 47 |
| <b>Figura 24-</b> Imagem da placa YPD inoculada com bentonite hidratada e a respectiva contaminação microbiológica .....  | 49 |
| <b>Figura 25-</b> Representação gráfica da variação do brix para diferentes variáveis ao longo do tempo .....   | 50 |
| <b>Figura 26-</b> Representação gráfica da variação da condutividade para diferentes variáveis ao longo do tempo.....   | 51 |
| <b>Figura 27-</b> Representação gráfica da variação da % de sal para diferentes variáveis ao longo do tempo .....   | 52 |
| <b>Figura 28-</b> Representação gráfica da velocidade de degradação da espuma para diferentes variáveis ao longo do tempo.....  | 53 |
| <b>Figura 29-</b> Representação gráfica da concentração de ácido cítrico para cada variável no início e no final da experiência .....   | 58 |
| <b>Figura 30-</b> Representação gráfica da concentração de ácido acético para cada variável no início e final da experiência.....   | 59 |
| <b>Figura 31-</b> Representação gráfica da concentração de ácido succínico para cada variável no início e final da experiência .....  | 60 |
| <b>Figura 32-</b> Representação gráfica da concentração de ácido málico para cada variável no início e final da experiência.....  | 61 |
| <b>Figura 33-</b> Representação gráfica da concentração de ácido láctico para cada variável no início e no final da experiência .....   | 62 |
| <b>Figura 34-</b> Representação gráfica da concentração de etanol para cada variável no início e no final da experiência .....  | 63 |
| <b>Figura 35-</b> Representação gráfica da concentração de glicerol para cada variável no início e no final da experiência.....   | 64 |
| <b>Figura 36-</b> Representação gráfica da concentração de maltose para cada variável no início e no final da experiência.....  | 66 |
| <b>Figura 37-</b> Representação gráfica da concentração dos compostos voláteis (ésteres, álcool monoterpénico, ácidos e compostos carbonilo) para cada variável no início (T0) e final da experiência (T7)..... | 69 |

**Figura 38**-Representação gráfica da concentração de álcoois superiores para cada variável no início (T0) e final da experiência (T7).....69

**Figura A. 1.** Representação da variação da temperatura de armazenamento ao longo de 120 dias..... 104

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> -Composição do mosto cervejeiro. Adaptado de Esslinger e Narziss (2005) .....  | 14 |
| <b>Tabela 2</b> -Composição química das leveduras em peso seco (%). Adaptada de Anger e Kruger (1990).....   | 24 |
| <b>Tabela 3</b> -Representação de agentes de desinfecção utilizados na indústria cervejeira. Adaptado de Praeckel (2009) e Orth (1998).....  | 26 |
| <b>Tabela 4</b> -Avaliação da reprodutibilidade do método entre as cinco amostras biológicas independentes (n=5) através da medição da média, desvio-padrão e variação percentual .....  | 43 |
| <b>Tabela 5</b> -Avaliação da reprodutibilidade do método entre as cinco amostras biológicas independentes (n=5) para a análise da velocidade de degradação da espuma através da medição da média, desvio-padrão e respetiva variação percentual. .... | 44 |
| <b>Tabela 6</b> -Valores de absorvância retirados aos 430 nm (comprimento de onda) para as diferentes variáveis ao longo do tempo.....   | 56 |
| <b>Tabela 7</b> -Variação da concentração dos compostos voláteis para cada variável ao longo do tempo. ....  | 67 |
| <b>Tabela 8</b> -Representação dos álcoois detetados na análise de GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 dias de experiência (T7) .....  | 70 |
| <b>Tabela 9</b> -Concentração do limiar de perceção de álcoois superiores e respetivos aromas .....  | 71 |
| <b>Tabela 10</b> -Representação dos ésteres na análise de GS - MS e respetivas concentrações de cada variável no final do dia 105 de experiência (T7). ....  | 72 |
| <b>Tabela 11</b> -Concentração do limiar de perceção dos ésteres acetato de isoamilo e do acetato de 2-feniletilo e respetivos aromas .....  | 73 |
| <b>Tabela 12</b> -Representação dos ácidos detetados na análise de GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 dias de experiência (T7) .....  | 74 |
| <b>Tabela 13</b> -Concentração do limiar de perceção dos ácidos octanóico e hexanóico e respetivo aroma .....  | 75 |
| <b>Tabela 14</b> -Representação dos compostos carbonilo e compostos fenólicos detetados na análise GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 de experiência (T7) .....   | 76 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 15</b> -Concentração limiar de percepção do composto fenólico 4-vinilguaiacol e respetivo aroma .....   | 77  |
| <b>Tabela 16</b> -Representação do álcool monoterpénico linalool detetado na análise GC – MS e respetivas concentrações de cada variável no início (T0) e aos 105 dias de experiência (T7) ....   | 77  |
| <b>Tabela 17</b> -Concentração limiar de percepção do álcool monoterpénico linalool e respetivo aroma .....   | 78  |
| <b>Tabela A. 1.</b> Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 1 através da medição da média e desvio-padrão .....   | 96  |
| <b>Tabela A. 2.</b> Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 2 através da medição da média e desvio-padrão .....   | 96  |
| <b>Tabela A. 3.</b> Avaliação dos triplicados técnicos de difrentes parâmetros da cerveja Standard 3 através da medição da média e do desvio-padrão.....  | 97  |
| <b>Tabela A. 4.</b> Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 4 através da medição da média e do desvio-padrão.....   | 97  |
| <b>Tabela A. 5.</b> Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 5 através da medição da média e do desvio-padrão.....   | 97  |
| <b>Tabela A. 6.</b> Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da pressão interna para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes ..... | 98  |
| <b>Tabela A. 7.</b> Representação dos valores médios e desvio-padrão do pH para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média desvio-padrão de duas amostras biológicas independentes.....                                 | 98  |
| <b>Tabela A. 8.</b> Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão do Brix para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes .....            | 99  |
| <b>Tabela A. 9.</b> Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da condutividade para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes .....   | 99  |
| <b>Tabela A. 10.</b> Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da % de sal para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes.....        | 100 |

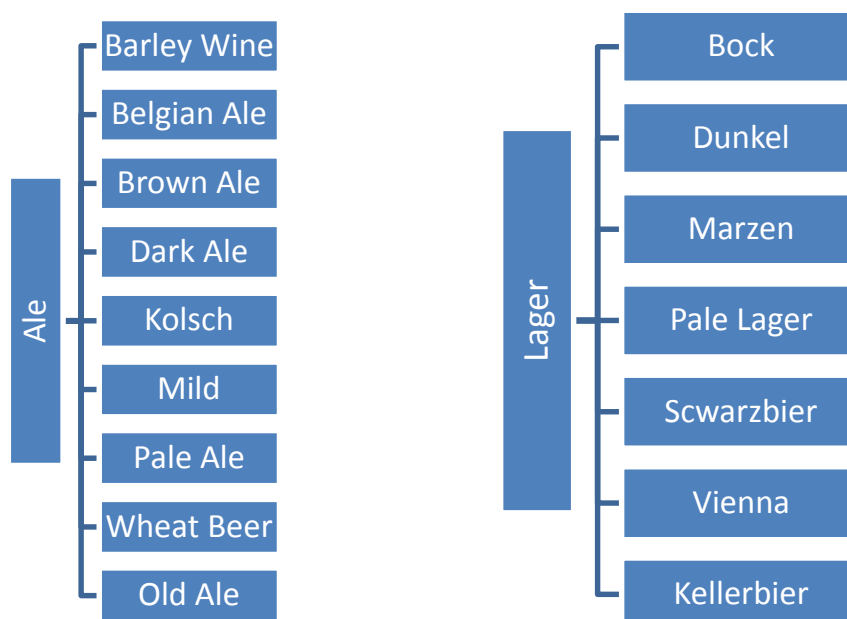


|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela A. 11</b> -Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão correspondentes à velocidade de degradação da espuma para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes..... | 100 |
| <b>Tabela A. 12.</b> Concentração dos compostos majoritários detetados nas sete variáveis por HPLC em T0 e T7 .....   | 101 |
| <b>Tabela A. 13.</b> Concentração dos compostos minoritários detetados nas sete variáveis por GC - MS em T0 e T7 .....  | 102 |

## 1. Introdução

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida a partir do processo fermentativo de cevada maltada, sendo presumivelmente das primeiras bebidas alcoólicas a serem produzidas pelo Homem (Hardwick, 1995). Atualmente, a nível mundial, é considerada a terceira bebida mais consumida a seguir à água e ao chá (Nelson, 2005).

Além da utilização de cevada, são igualmente adicionados água, lúpulo e leveduras. No fim da fermentação, a cerveja contém álcool, dióxido carbono (CO<sub>2</sub>) e extratos aromáticos (Esslinger e Narziss, 2005). Os diferentes tipos de cerveja têm dois grupos principais, sendo estes: cerveja de fermentação alta ou *ale* e cervejas de fermentação baixa ou *lager*. Conforme o esquema da Figura 1, as cervejas do tipo *ale* estão incluídas cervejas como: Dark ale, Belgian ale, Brown ale, Pale ale entre outras. Este tipo de cerveja é muito característico no Reino Unido. Nas cervejas *lager*, podemos identificar alguns estilos de cervejas, tais como: Bock, Marzen, Dunkel, Schwarzbier, Vienna entre outras (Bamforth, 2003).



**Figura 1**-Esquema com diferentes estilos de cerveja de acordo com o tipo de fermentação: *Ale* ou *Lager*. Adaptado de (<https://microbrewery.wordpress.com/tag/beer-types-2/>)

Atualmente existem estudos científicos que indicam que beber cerveja com moderação traz benefícios para a saúde, tais como: redução de problemas cardiovasculares, osteoporose e diabetes (Mignani *et al.*, 2013). Além disso, a cerveja é a única bebida que contém lúpulo em

quantidade suficiente para ser considerada uma fonte dietética. Além de fornecer o sabor amargo à cerveja e conter agentes de preservação, o lúpulo é uma fonte única de iso-humulonas, responsáveis pela redução da hiperglicemia (Mignani *et al.*, 2013). Além disso, o lúpulo contém na sua composição um polifenol denominado de xantohumulol que tem propriedades anticancerígenas e antioxidantes (Stevens and Page 2004, Gerhäuser 2005).

Tendo como base de apoio dados recolhidos pela associação *The Brewers of Europe*, em 2005, Portugal ocupava o 11º lugar entre os 17 produtores europeus. O setor português de produção de cerveja apresentou uma produção total de 744,3 milhões de litros. Neste estudo, pôde-se verificar que Portugal era o 7º maior exportador de cerveja no espaço europeu, exportando aproximadamente 131 milhões de litros correspondendo a 18% da produção total de cerveja no país. Através dos dados fornecidos podemos verificar que o setor cervejeiro é de extrema relevância para a economia nacional, em particular para o setor da restauração, onde estão englobados 100 milhões de euros. Também o setor da agricultura e o *marketing* têm algum peso na economia nacional movimentando cerca de 53 milhões de euros.

Em 2011, Portugal encontrava-se no Top-40 mundial de fabrico de cerveja, estando no 15º lugar a nível europeu estimando uma produção de 825 milhões de litros/ano com um valor na ordem dos 166 milhões de euros/ano e um consumo de cerveja *per capita* de 56 litros. Mundialmente, a China é o maior produtor de cerveja, produzindo cerca de 48988 milhões de litros. Em todo o mundo, são produzidos cerca de 1925100 milhões de litros de cerveja (The Barth-Haas Group, 2011).

A nível mundial, a produção de cerveja artesanal tem vindo a crescer nos últimos anos. Na sua grande parte, a cerveja artesanal é obtida a partir de receitas originárias de países como a Alemanha e Inglaterra, sendo o processo de fabricação relativamente lento e a produção em geral de pequena escala (Kleban e Nickerson, 2011). Segundo a associação de cervejeiros norte-americana *BrewerAssociation.org*, os Estados Unidos da América é neste momento, o país com maior produção de cerveja artesanal no mundo. Em 2013 produziu cerca de 1796 milhões de litros de cerveja artesanal com um valor na ordem dos 14,3 mil milhões de dólares (*brewersassociation*). Globalmente, a cerveja artesanal é produzida do mesmo modo que a cerveja comercial, contudo são aplicadas algumas alterações no seu processo de fabrico, uma vez que as cervejas artesanais utilizam maioritariamente na sua composição diferentes cereais maltados e lúpulo natural, originando diferentes tipos de cervejas com sabores distintos. A indústria cervejeira utiliza diversos aditivos, tais como gomas de amido e extratos de glucose, em substituição do

malte não favorecendo algumas das características mais apreciáveis da cerveja, deixando-a pobre em sabores, textura, aromas, cor entre outras. Também a utilização de extratos de lúpulo, pelo facto de serem mais baratos, terem maior tempo de prateleira e uma aplicação facilitada ao processo, acabaram por substituir os lúpulos em flor. Esta substituição da flor pelos extratos de lúpulo torna a cerveja menos aromática e sem as notas florais, sendo que nas cervejas artesanais são privilegiados os lúpulos em flor. Por estes motivos, as cervejas artesanais têm um preço mais elevado em relação às cervejas industriais (Giovenzana *et al*, 2014).

De um modo geral, as cervejas de cariz artesanal não são filtradas nem pasteurizadas e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) presente na cerveja é oriundo da fermentação alcoólica. A ausência de filtração faz com que as leveduras (ricas em vitaminas) fiquem em suspensão na cerveja enriquecendo-a nutricionalmente. Também a inexistência de pasteurização serve para manter o gosto original da cerveja, mantendo inalteradas as características sensoriais, bem como preservar as leveduras vivas na cerveja. Este factor também muito contribuiu para o baixo tempo de prateleira que as cervejas artesanais possuem, situando-se em geral entre os 4 e os 8 meses, dependendo maioritariamente do grau de álcool e quantidade de lúpulo usado na receita de cerveja (Matos, 2011).

Pelo facto do conceito de cerveja artesanal, ser mais local e regional comparativamente ao conceito industrial os produtores de cerveja artesanal tendem a envolver-se com a comunidade em que estão inseridos através da filantropia, doações de produtos, voluntariado e até de patrocínio de eventos locais. A cerveja artesanal está centrada para um nicho de mercado, atraindo novos consumidores que procuram uma “revolução do gosto” de cervejas, estando em pleno crescimento. Estes consumidores não se importam de pagar mais por uma cerveja desde que obtenham satisfação com a sua compra.

Deste modo, conclui-se que os dois pontos-chave de aposta por parte dos produtores de cerveja artesanal são os consumidores com algum poder económico que procuram uma nova experiência de sabores e aromas ao beberem uma cerveja (Kleban e Nickerson, 2011).

## 1.1. Tecnologia de produção de cerveja

### 1.1.1 *Matérias-primas*

**Água:** Matéria-prima que cada vez mais acarreta elevados custos de consumo e é cada vez mais escassa (Lewis e Young, 1991). A água utilizada na produção de cerveja deve ter diferentes composições ou tratamentos apropriados para as funções necessárias. O uso desta matéria-prima pode ser dividido em 4 categorias principais: a) água para a produção de cerveja, ou seja, contribui diretamente como ingrediente, correspondendo a uma percentagem maioritária dos compostos d cerveja (depende da quantidade de álcool), tem de ser potável e ter uma composição em sais minerais apropriada ao estilo de cerveja a produzir; b) água para limpeza e esterilização, que vai ser utilizada nas operações de esterilização das bombas, tubos e válvulas e por isso não pode conter microrganismos e aromas pois pode alterar a qualidade do mosto; c) água de serviço, que é dependente das especificações solicitadas pelos construtores dos equipamentos; e d) água de uso geral que é usada para a limpeza do espaço físico onde decorre o processo cervejeiro. Por norma não é necessário nenhum tratamento extra (Taylor, 2006).

Contudo, com os estudos da composição química da água, hoje é possível retirar e adicionar sais para melhorar a qualidade da água e permitir o fabrico de qualquer tipo de cerveja em qualquer parte do mundo (Hough, 1990).

**Cevada:** É um tipo de cereal que pertence à família da gramínea cerealífera (*Gramineae*) (Esslinger e Narziss, 2005). Esta matéria-prima tem a capacidade de fornecer o amido necessário para a fabricação de cerveja (Kendal, 1995). No entanto, após colheita, este cereal não contém as enzimas necessárias para a degradação do amido e a moagem não é eficiente devido à dureza do grão da cevada, resultando num extrato muito viscoso e deficiente em aminoácidos.

Assim o grão de cevada, para utilização na produção de cerveja, necessita de sofrer modificações físicas, químicas e biológicas sendo chamado de malte. (Lewis e Young, 1995). O processo realizado para a obtenção do malte é denominado de maltagem.

No processo de maltagem, o malte obtido a partir da cevada deve conter enzimas adequadas para a degradação do amido, tais como:  $\beta$ -amilase, proteases e  $\beta$ -glucanases e com elevada atividade enzimática. Atualmente existem cevadas maltadas transgênicas onde genes são expressos para fornecer propriedades benéficas específicas para os produtores de cerveja, tais como genes que

codificam enzimas que desempenham um papel importante na degradação do amido (Linko *et al.*, 1998).

**Cereais não-maltados:** São utilizados por razões económicas ou por insuficiente quantidade de amido obtido a partir do malte de cevada. Também podem ser utilizados para alterar o aromas e sabores da cerveja, restabelecer a quantidade de malte e aumentar a percentagem de proteínas presentes no mosto. O trigo, o milho e o arroz são exemplos de cereais não maltados usados no processo cervejeiro (Lewis e Young, 1995).

**Lúpulo:** É uma planta aromática que é adicionada no processo durante a ebulição do mosto, sob as formas de *pellet*, flor ou extrato (Figura 2). Este é considerado um ingrediente indispensável na produção de cerveja, pois confere aroma e amargor à cerveja, promove uma melhor clarificação e uma boa formação de espuma. Além disso, o lúpulo tem propriedades antimicrobiológicas, protegendo a cerveja de microrganismos (van der Sman *et al.*, 2012). O lúpulo contém  $\alpha$ -ácidos (2–15%), que são convertidos por um processo de isomerização, em iso- $\alpha$ -ácidos conferindo o amargor às cervejas (Lewis e Young, 1995). Tem havido desenvolvimento de novas variedades de lúpulo com o objetivo da obtenção de sabores e aromas específicos. Por exemplo, o lúpulo do tipo *Mandarina Bavaria* foi criado em 2012 e deriva do cruzamento de duas variedades distintas de lúpulo: Cascade e Huell (Kammhuber *et al.*, 2013). Este tem um aroma frutado com notas cítricas e de tangerina combinando com as tradicionais características do lúpulo podendo ser usado tanto na produção de cervejas *lager* como de cervejas *ale*. (Kammhuber, 2013).



**Figura 2-a)** Plantação de lúpulo; **b)** Lúpulo em forma de pellet

**Leveduras:** São microrganismos vivos responsáveis pelo consumo dos açúcares do mosto libertando etanol,  $\text{CO}_2$ , e uma grande diversidade de metabolitos durante o seu metabolismo aeróbio e anaeróbio, totalizando sensivelmente 600 a 800 compostos que compõem a cerveja final (Angelino, 1991 ; Lewis e Young, 1995). Para a produção de cerveja, esta deverá ter: uma elevada taxa de fermentação (sem crescimento excessivo da levedura), uma eficiente utilização dos açúcares com boa conversão a etanol e produção de compostos aromáticos nas quantidades apropriadas (Spencer *et al.*, 1990). As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem à família de *Saccharomycetaceae* e do género *Saccharomyces*.

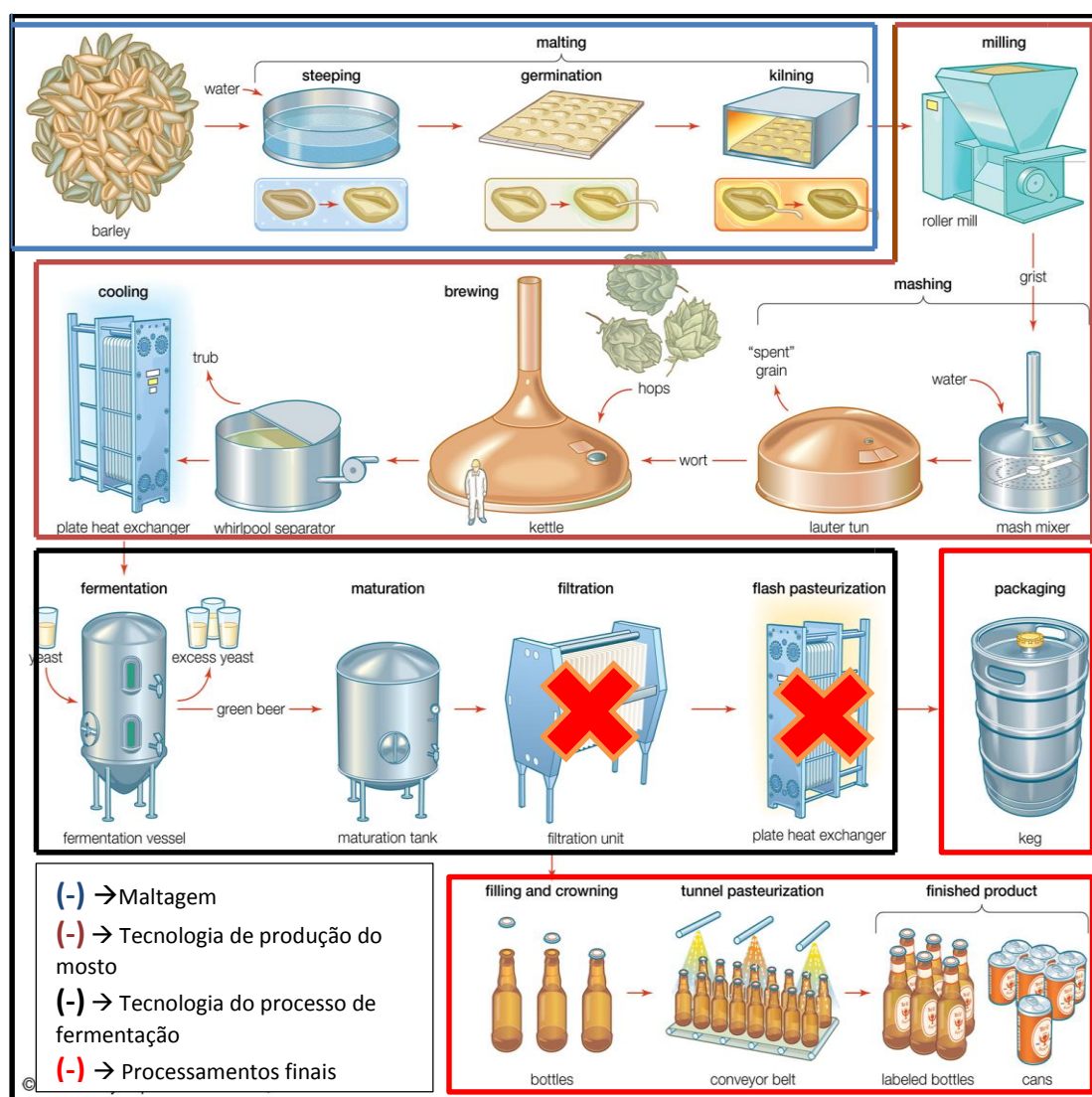
**Auxiliares de fermentação:** Cereais, xaropes e açúcares são utilizados para complementar o amido do malte. Alguns exemplos de cereais utilizados são: flocos de milho, farinha de trigo, grânulos de arroz e milho. Os xaropes são obtidos a partir do trigo, cevada ou milho e são produzidos através de tratamentos enzimáticos ou através de tratamentos com ácidos (Lewis e Young, 1995). Os adjuntos de malte são uma alternativa para a diminuição de custos na produção de cervejas e podem acrescentar atributos sensoriais e aromáticos às cervejas (Carvalho *et al.*, 2009).

**Outras adições:** Pode ainda ser adicionado  $\text{CO}_2$ , caramelos, óleo de lúpulo e produtos antimicrobianos. O  $\text{CO}_2$  é usado como condicionador de cerveja, carbonatando-a. (Lewis e Young, 1995). A concentração ideal de  $\text{CO}_2$  nas cervejas é de 0,5% (Vassoler, 2009). Os caramelos são usados para fornecer cor e sabor à cerveja. O óleo de lúpulo confere aroma e gosto amargo. O uso de produtos antimicrobianos (ex: dióxido de enxofre) é permitido, desde que estejam numa gama de concentrações de 20-50 p.p.m (Lewis e Young, 1995). Podem ainda ser adicionados sais, tais como o zinco e potássio ao mosto, pois este, em geral, tem um défice em alguns micronutrientes, sendo estes essenciais para o crescimento da levedura e ocorrência de uma boa fermentação dos açúcares (Ryder e Power, 2006).

## 1.2. Processo cervejeiro

Dependendo do tipo específico de cerveja que se pretende obter, existem diversas variações na elaboração do processo cervejeiro. Nas cervejas do tipo *lager*, a levedura fica retida no fundo do fermentador até finalizar a fermentação. Já as cervejas do tipo *ale*, são elaboradas com leveduras de fermentação alta, ou seja, estas ascendem até ao topo do fermentador e são retiradas pela superfície do fermentador (Linko *et al.*, 1998).

A produção de cerveja industrial está dividida em quatro etapas bem delineadas (Figura 3), sendo elas: a maltagem, a preparação do mosto, a fermentação (primária e secundária) e os processamentos finais (Linko *et al.*, 1998). Em geral, na produção de cerveja artesanal não se realiza a etapa da maltagem, uma vez que o cereal comprado já vem maltado.



**Figura 3**-Esquema ilustrativo do processo cervejeiro artesanal. Adaptado de (Bubacz, McCreanor et al. 2013)



### 1.2.1. *Maltagem*

O processo de maltagem consiste na germinação do grão de cevada em condições controladas. Os principais objetivos da maltagem são o desenvolvimento de enzimas no grão e a degradação de substâncias de elevado peso molecular nas paredes celulares. Além disso, espera-se que o grão desenvolva uma determinada cor e desenvolva novos compostos aromáticos e que sejam removidos outros compostos aromáticos não desejados (ex: S-metilmetionina e dimetil sulfóxido). Este processo está dividido em quatro etapas distintas: limpeza e clarificação, infusão, germinação e secagem da cevada (Esslinger e Narziss, 2005).

**Limpeza e clarificação:** Nesta etapa são retiradas poeiras, sementes e outros grãos. De seguida, classifica-se a cevada em conformidade com o tipo e tamanho de cevada (Kendall, 1995).

**Infusão:** A infusão é realizada em tanques com base cônica com água a 12-16 °C e ar através de anéis submersos durante 48 horas (Figura 4-a)). Esta etapa tem como finalidade, aumentar o teor de humidade do grão de 11-12% para 43-46% em dois dias (Esslinger e Narziss, 2005). A infusão vai dar início ao processo de germinação e ao desenvolvimento de ácido giberélico no embrião germinado, facilitando o transporte e a atuação do ácido giberélico na camada da aleurona e hidratando o endosperma até modificação enzimática do endosperma (Kendall, 1995).

**Germinação:** Os grãos de cevada permanecem na câmara durante 3-5 dias a uma temperatura de 15-22 °C e com níveis de humidade compreendidos entre 43-46% (Figura 4-b)). O fornecimento de ar sustenta a respiração dos grãos, e ocorre a formação de produtos tais como: dióxido de carbono e calor, sendo estes removidos (Kendall, 1995). Os principais objetivos da germinação são: induzir o aumento de enzimas hidrolíticas e a modificação enzimática do endosperma (Esslinger e Narziss, 2005).

**Secagem:** Esta etapa consiste na secagem do malte verde de modo a interromper as transformações químicas e biológicas que ocorrem durante a germinação, inibindo a atividade enzimática, conferindo ao malte uma cor específica e formação de compostos aromáticos (Figura 4-c)) (Kendall, 1995). A secagem é realizada aproximadamente durante 18 horas e a temperatura vai de 50-80°C levando à redução do teor de humidade do malte de 43% a 5% (Esslinger e Narziss, 2005).



**Figura 4- a)** Infusão da cevada; **b)** Germinação da cevada; **c)** Secagem do malte;

### 1.2.2. Tecnologia da produção do mosto

Na produção do mosto cervejeiro estão envolvidas as seguintes etapas: moagem do malte, brassagem, filtração do mosto, aquecimento e separação do *trub* quente, arrefecimento do mosto e por último a separação do *trub* frio. (Lewis e Young, 1995).

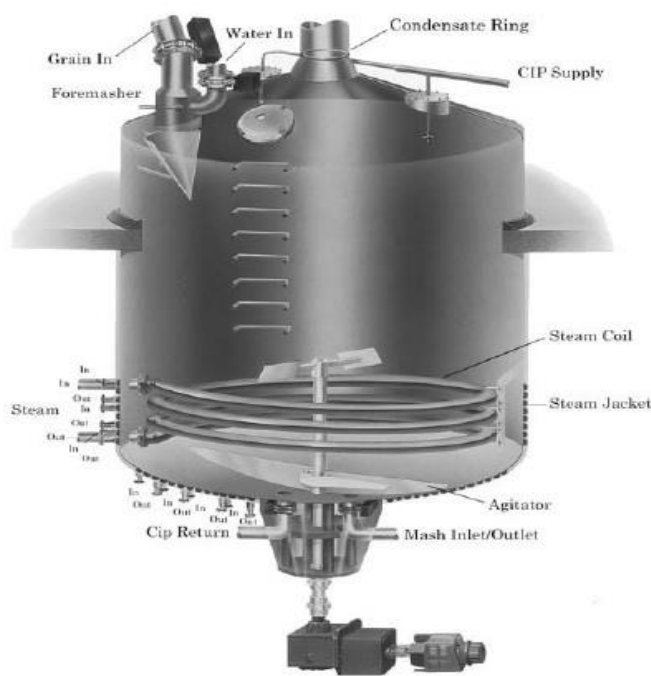
**Moagem do malte:** A principal função da moagem é quebrar os grãos de malte e deste modo, expor o endosperma do grão à água. Sendo a moagem um processo mecanizado, esta deve evitar a danificação das cascas pois contêm taninos, substâncias coradas e compostos amargos que são indesejáveis para a produção do mosto. Além disso, as cascas podem servir de material filtrante aquando da filtração e consequente separação do mosto (Briggs *et al.*, 2004). Segundo Lewis e Young, (1995), a moagem do malte é em geral realizado a seco, podendo ser misturado com água. O produto obtido da moagem do malte é designado de *gritz*.

**Brassagem:** Esta etapa ocorre num tanque de brassagem (Figura 5) e dá-se a mistura do malte e de cereais não maltados moídos com água quente (Eaton, 2006). Este processo é controlado e tem uma duração de 2-4 horas. O principal objetivo da brassagem é permitir que as enzimas contidas no malte moído degradem as proteínas, os hidratos de carbono e as substâncias fenólicas permitindo a obtenção de açúcares que são utilizados durante a etapa de fermentação e de compostos azotados utilizados como nutrientes pelas leveduras (Rehberger e Luther, 1995).

A etapa de brassagem inicia-se com o aquecimento da mistura durante um período de 10-40 minutos, a uma gama de temperatura de 43-49°C. Este aquecimento vai possibilitar que ocorra a hidratação dos grãos moídos do malte e consequente solubilização dos péptidos e açúcares. Dependendo da modificação das proteínas, do tipo de enzimas que o malte contém e das condições de brassagem aplicadas, vão ser formados péptidos e aminoácidos e substâncias proteicas de alto peso molecular (responsáveis pela formação de espuma). Esta gama de temperaturas aplicadas à mistura vai contribuir para a libertação da enzima  $\beta$ -glucanase contida no malte que é responsável por hidrolisar os  $\beta$ -glucanos que são responsáveis por causar dificuldades na etapa de filtração pois aumentam a viscosidade do mosto (Esslinger e Narziss, 2005).

Seguidamente, aumenta-se a temperatura da mistura em valores compreendidos entre os 62-65°C com uma duração de 20-60 minutos (Lewis e Young, 1995). Por volta dos 50°C ocorre a hidrólise das gomas, das hemicelulases (amido) e dos fosfatos em dextrinas e açúcares fermentáveis. A  $\beta$ -amilase é a enzima responsável pela hidrólise das gomas e do amido durante a brassagem. Esta enzima tem uma temperatura ótima de ativação de 62°C.

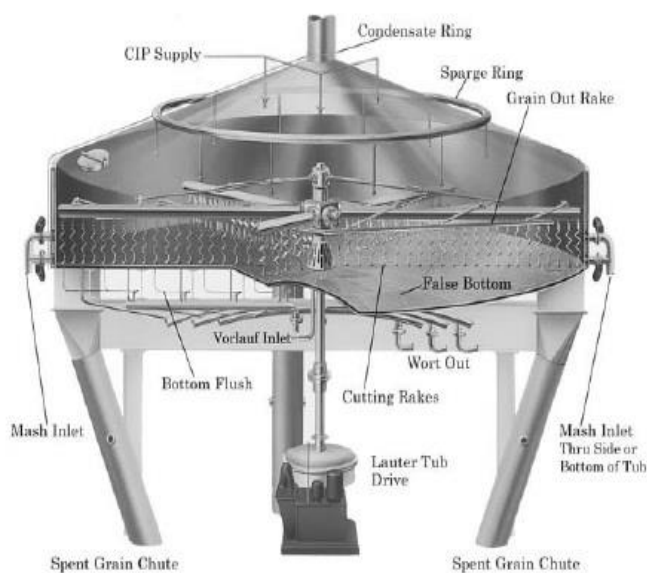
Por fim, eleva-se a temperatura até aos 78°C ocorrendo a desativação das enzimas. Durante a etapa da brassagem, o pH deve estar compreendido entre 5,4-5,6 (Esslinger e Narziss, 2005).



**Figura 5-** Diagrama de um tanque de brassagem (Bamforth, 2003)

**Filtração do mosto:** A filtração do mosto consiste na separação das partículas granulares (*drêches*) do mosto (fase líquida), de modo a não modificar as características químicas, conservando o fornecimento de péptidos e aminoácidos para a nutrição da levedura, de açúcares fermentáveis para a formação de álcool, de proteínas para a formação da espuma de cerveja e de açúcares não fermentáveis essenciais para o aroma da cerveja (Rehberger e Luther, 1995).

Um dos métodos mais utilizados para a separação do mosto na cerveja artesanal é realizado num tanque (*Lauter Tun*) (Figura 6), geralmente com forma cilíndrica e com escoamento do mosto através de tubos ou por fendas cravadas através do qual este é recuperado. Além disso, no interior do recipiente existem braços que podem ser rodados em torno de um eixo central e auxiliam na filtração e consequente separação do mosto (Bamforth, 2003).



**Figura 6-** Diagrama de um tanque de clarificação do mosto (Bamforth, 2003)

Também os grãos que ficam retidos servem como um filtro natural para as próximas filtragens (Evangelista, 2012).

A separação do mosto utilizando o filtro de prensa tem uma eficiência de extração (rendimento de extrato) de cerca de 70-75%. Esta etapa dura 2-3 horas e ocorre numa gama de temperaturas de 75-80 °C (Rehberger e Luther, 1995). Este método de separação por filtros de prensa está associado às cervejas comerciais.

**Ebulição do mosto:** Ocorre numa caldeira durante 1-2 horas e é responsável pela esterilização do mosto (Lewis e Young, 1995). O elevado calor inativa as enzimas mais resistentes ao calor e microrganismos que comprometam o processo de produção e que possam ter sobrevivido à etapa

de brassagem e à filtração do mosto. Esta etapa serve também para eliminar o risco de desenvolvimento de aromas indesejáveis removendo-os por evaporação levando à formação de substâncias redutoras, como as melanoidinas, que intensificam a cor do mosto, pela evaporação da água em excesso, de maneira a obter uma desejável concentração do mosto (extrato original) (Rehberger e Luther, 1995). Além disso, remove por precipitação, as proteínas que poderiam causar alterações organoléticas nas cervejas produzidas, pois estas tendem a coagular quando sujeitas a elevadas temperaturas (Bamforth, 2003). Nesta etapa ocorre a adição do lúpulo ao mosto, com isomerização dos  $\alpha$ -ácidos a iso- $\alpha$ -ácidos, concedendo características aromáticas à cerveja e o amargor correspondente a cada receita. A isomerização dos alfa-ácidos a iso- $\alpha$ -ácidos não é uma reação particularmente eficiente, já que somente 50% dos  $\alpha$ -ácidos são convertidos durante a ebulição do mosto e somente 25% dos iso- $\alpha$ -ácidos permanecem na cerveja produzida no final do processo.

Os compostos fenólicos presentes no malte e no lúpulo adicionado ao mosto reagem com as proteínas formando complexos moleculares. Estes não se solubilizam no mosto e são removidos por decantação (Rehberger e Luther, 1995).

**Separação do *trub* quente:** Ocorre a separação do precipitado proteico e dos constituintes do lúpulo que não solubilizaram, através de um método de clarificação do mosto. O *trub* quente é constituído por 40-70% de proteína, 7-15 % de substâncias amargas e 20-30 % de outros compostos orgânicos tais como substâncias minerais e polifenóis (Esslinger e Narziss, 2005).

Presentemente, a opção mais usada é a utilização de um tanque *Whirlpool* já que o lúpulo adicionado ao mosto tem a forma de *pellet* ou extrato e a filtração não é eficaz podendo provocar entupimento do filtro. Assim, o mosto é bombeado tangencialmente dentro de um tanque cilíndrico, formando-se uma corrente rotatória em que as partículas sólidas suspensas no líquido são separadas por fricção, depositando-se no fundo do tanque, acumulando-se e formando um bolo (Lewis e Young, 1995).

**Arrefecimento do mosto:** O mosto é arrefecido até à temperatura ótima desejada para a inoculação da levedura. Esta temperatura ótima depende do tipo de cerveja que se pretende produzir. No caso das cervejas *lager* vai de 8-12 °C e para as cervejas do tipo *ale* vai de 15-22 °C (Lewis e Young, 1995). O processo deve ser realizado rapidamente e em condições assépticas de maneira a reduzir as hipóteses de crescimento ou desenvolvimento de contaminações por

microrganismos e interromper reações químicas (Rehberger e Luther, 1995). O arrefecimento do mosto é realizado em duas partes. Na primeira parte, a água deve ter uma temperatura de 15 °C e é utilizada de modo a arrefecer o mosto até a uma temperatura de aproximadamente 85°C. Na segunda parte pode ser usada água a uma temperatura de 1-2°C ou utilizados refrigerantes (água congelada, soluções de propileno-glicol ou expansão direta de amónia) de modo a reduzir a temperatura intermédia do mosto (85°C) até à temperatura requerida para a etapa de fermentação (Barnes, 2006). No arrefecimento do mosto são utilizados permutadores de calor de placas ou tubulares. Estes são responsáveis por extrair o calor ao mosto e gerar água quente que pode ser reciclada no processo cervejeiro para a produção do mosto, esterilização de equipamentos e limpezas (Briggs *et al.*, 2004). No final da etapa de arrefecimento o mosto deverá ser oxigenado, geralmente em linha, no sentido de garantir uma saturação do mosto em oxigénio ( $\sim 8$  ppm) para permitir um crescimento adequado da levedura cervejeira durante o início da etapa de fermentação.

**Separação do *trub* frio:** Tem por objetivo remover do mosto, partículas de tamanho inferior a 1 mm, que para temperaturas abaixo dos 60 °C, não se solubilizam, precipitando, originando uma turbidez indesejável no mosto (Esslinger e Narziss, 2005).

Na indústria cervejeira moderna, o *trub* é retirado nos tanques de flotação. A nível artesanal, muitas vezes, o *trub* não é removido na totalidade, decantando junto com as leveduras para o fundo do fermentador (Cruz *et al.*, 2008).

**Tabela 1-** Composição do mosto cervejeiro. Adaptado de Esslinger e Narziss (2005)

|                            |                           |  |
|----------------------------|---------------------------|--|
| Hidratos de Carbono (100%) | Hexose                    | 7-9 %  |
|                            | Sacarose                  | 3%   |
|                            | Maltose                   | 43-47%   |
|                            | Maltotriose               | 11-13%   |
|                            | Dextrinas                 | 25-36%   |
|                            | Pentosanos                | 3-4%   |
|                            | Colas                     | 0,20%  |
| Compostos azotados         | Azoto total               | 950-1150 mg/L                                    |
|                            | De baixo peso molecular   | 200-300 mg/L                                     |
|                            | De elevado peso molecular | 550-700 mg/L                                     |
| Substâncias de amargor     |                           | 25-35 EBC<br>Unidades amargor                    |
| Polifenóis                 | Polifenóis totais         | 180-250 mg/L                                     |
|                            | Antocianidinas            | 70-110 mg/L                                      |
| Minerais                   |                           | 15-20 mg/L<br>(80% inorgânicos<br>20% orgânicos) |
| Zinco                      |                           | 0,1-0,25 mg/L                                    |
| pH                         |                           | 5,0-5,7  |
| Viscosidade (20°C)         |                           | 1,7-2,0 mPa . S                                  |

### 1.2.3. Tecnologia do processo de fermentação

**Fermentação primária:** Consiste na fermentação do mosto previamente arejado e arrefecido na etapa anterior por leveduras seleccionadas, num determinado período de tempo, até atingir a densidade específica desejável (Lewis e Young, 1995).

Segundo Briggs *et al.*, (2004), os fermentadores mais utilizados na atualidade, inclusive na produção de cerveja artesanal, são os fermentadores cilíndricos (Figura 7). Estes permitem uma fácil recolha do CO<sub>2</sub> e a eficiente remoção das leveduras pela base cônica no final da etapa de fermentação.

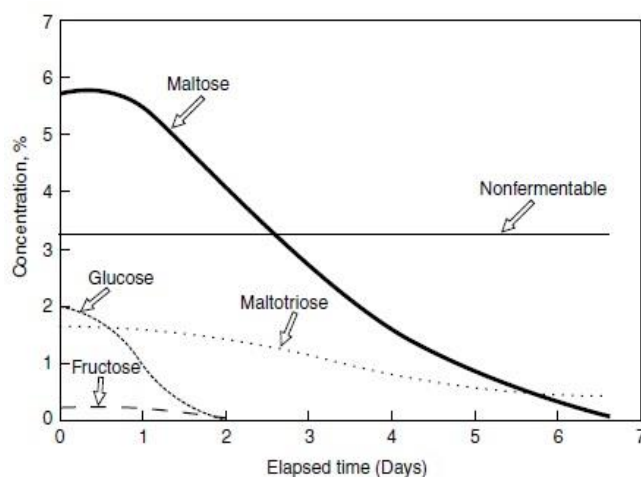


**Figura 7-** Representação esquemática de um fermentador cilíndrico cônico (Bamforth, 2003)

Durante as primeiras 6-10 horas, a levedura consome todo o oxigênio dissolvido até que, após 8-16 h aparecem os primeiros sinais de fermentação com a formação de bolhas de  $\text{CO}_2$ , espuma e calor. O pH desce até a uma gama de valores compreendidos entre 3,8-4,4 devido à produção de ácidos orgânicos e ao consumo de compostos com efeito tampão, antes de aumentar em direção ao fim da fermentação (Munroe, 2006).

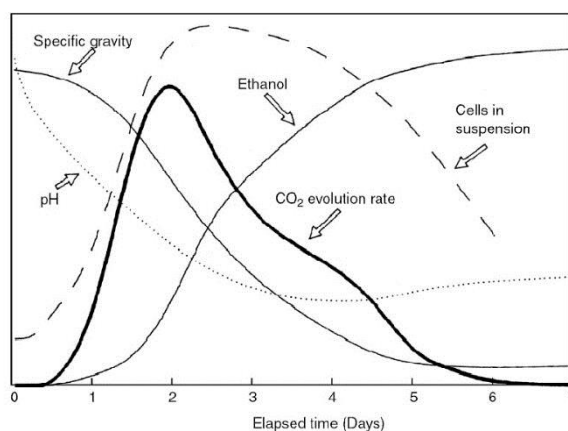
As substâncias dissolvidas no mosto são fermentadas pelas leveduras produzindo etanol e dióxido de carbono. Primeiramente, as leveduras hidrolisam as hexoses e sacarose (açúcares primários) e seguidamente hidrolisam maltoses e maltotrioses (açúcares secundários).





**Figura 8-** Perfil de assimilação de hidratos de carbono. Representação gráfica de açúcares fermentáveis durante a fermentação (Munroe, 2006)

Esta reação é considerada exotérmica (liberta calor) e é designada de glicólise. Devido à libertação de calor durante a fermentação, é necessário arrefecer o mosto de modo a controlar a temperatura de fermentação (Munroe, 2006).



**Figura 9-** Representação gráfica relativo aos perfis de pH, etanol, CO<sub>2</sub>, densidade do mosto e células em suspensão ao longo da fermentação (Munroe, 2006).

A temperatura de fermentação varia desde o início até ao final da fermentação e depende do tipo de cerveja que se produz. A duração de uma fermentação tradicional é de 8-20 dias, mas se esta ocorrer a altas temperaturas, o período de fermentação reduz para 7 dias. A fermentação das cervejas do tipo *lager* e *ale* são conduzidas numa gama de temperatura de 7-14 °C e 18-25 °C respetivamente, dando-se a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono (Munroe,

2006). No processo industrial de produção de cerveja, a levedura é separada por centrifugação ou filtração. No entanto, no processamento de cerveja artesanal, a remoção da levedura faz-se por decantação. O arrefecimento da temperatura do fermentador pode auxiliar no processo de separação da levedura, permitindo que esta assente mais facilmente (Munroe, 1995).

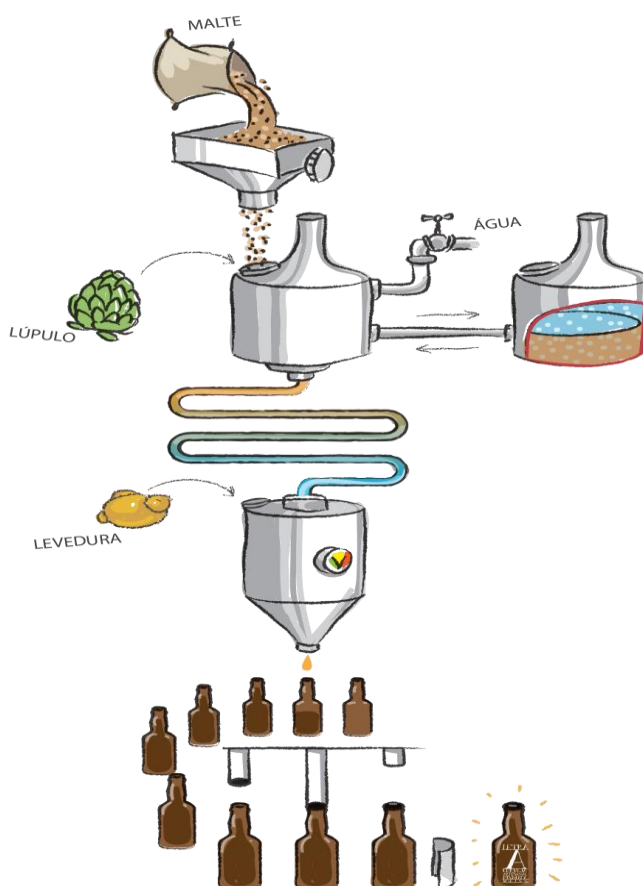
**Fermentação secundária:** Esta etapa consiste em deixar a cerveja, após a primeira fermentação, em contato com leveduras, não sendo removidas na sua totalidade (Lewis e Young, 1995). Tem uma duração muito variável, entre os 7 e 30 dias e envolve uma progressiva diminuição de temperatura (Esslinger e Narziss, 2005). A presença de levedura residual permite a re-assimilação de alguns compostos aromáticos prejudiciais, produzindo um produto maturado (Munroe, 1995). Além disso, a presença da levedura pode prevenir oxidação do mosto fermentado, uma vez que esta absorve instantaneamente o oxigénio que possa entrar em contato com a cerveja (Lewis e Young, 1995).

**Estabilização:** Esta etapa é considerada essencial pois ocorre a estabilização coloidal da cerveja. A cerveja pode formar proteínas de elevado peso molecular e taninos que tendem a agregar-se, levando a um aumento da turvação. Na indústria cervejeira, são adicionados à cerveja, produtos com poder adsorvente e/ou precipitante, tais como: bentonite, sílica, gelatina, entre outros. A cola precipitante mais utilizada denomina-se de polivinilpirrolidona (PPVP) e remove compostos tanínicos por agregação e consequente precipitação no fundo do fermentador (Munroe, 1995). Na produção de cerveja artesanal, esta etapa apenas envolve um decréscimo gradual da temperatura (0 - 2 °C) da cerveja e consequente deposição de leveduras no fundo do fermentador não sendo adicionado qualquer tipo de produto com poder precipitante. Esta etapa leva à diminuição da turvação da cerveja (Lewis e Young, 1995). No final da estabilização, os valores de pH da cerveja estão compreendidos entre 4.3 - 4.6 permanecendo constantes (Esslinger, 2009). Esta etapa vai originar uma cerveja com maior estabilidade química e biológica (Esslinger e Narziss, 2005).

#### 1.2.4. Processamentos finais

**Enchimento:** A etapa final da produção de cerveja corresponde ao enchimento. A cerveja pode ser acondicionada em diversos tipos de embalagens, tais como lata, garrafa ou barril, evitando ao máximo o contacto com  $O_2$  de modo a evitar uma possível oxidação da cerveja. Na produção de cerveja a nível industrial, é necessário proceder-se à estabilização biológica da cerveja, antes ou após o enchimento, recorrendo a uma pasteurização (1 min a 70 °C) ou realizada a frio através de uma filtração esterilizante (Lewis e Young, 1995). No entanto, na produção de cerveja artesanal não ocorre a etapa de pasteurização/esterilização da cerveja mantendo-se inalteradas características sensoriais presentes na cerveja e a obtenção de um produto 100% natural para o consumidor (Matos, 2011).

A Figura 10 ilustra o processo de fabrico de cerveja artesanal.



**Figura 10-** Processo de fabrico cervejeiro artesanal (Retirado de [www.cervejaetra.pt](http://www.cervejaetra.pt))

### 1.3. Fatores que influenciam a estabilidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira.

Além do aroma, espuma e da estabilidade biológica e coloidal, a característica mais importante da qualidade da cerveja é a estabilidade do sabor e aroma. Estabilidade significa ter capacidade para manter as suas características inalteradas desde o momento do enchimento até a cerveja ser consumida.

Diversos fatores podem contribuir para a alteração da estabilidade e consequente qualidade da cerveja, tais como: temperatura de armazenamento, tipo de levedura, exposição à luz, exposição ao O<sub>2</sub> durante enchimento, tempo de armazenamento, contaminações por microrganismos indesejados, entre outras.

Estes fatores podem originar reações de oxidação dos componentes naturais da cerveja (álcoois superiores, melanoidinas, aminoácidos, ácidos gordos, resinas de lúpulo). Além disso, vários componentes são formados, sendo os compostos de carbonilo, em particular aldeídos, os mais influentes para a estabilidade da cerveja (Lewis e Young, 1995).

A utilização de colas de estabilização, como é o caso da bentonite, faz com que a cerveja fique clarificada por precipitação/adsorção de compostos proteicos presentes na cerveja. A utilização destas colas origina uma cerveja menos turva, contudo, vai originar mudanças nas características sensoriais (Lewis e Young, 1995).

Na produção de cerveja, a levedura é responsável pela formação de um conjunto de processos bioquímicos complexos, levando à produção de diversos compostos, tais como: etanol e CO<sub>2</sub>, ácidos e compostos aromáticos (álcoois superiores, ésteres e ácidos gordos) que vão influenciar fortemente o sabor, aroma e o odor da cerveja final (Gresser, 2009).

As modificações físico-químicas não acontecem simultaneamente. Algumas mudanças aparecem muito cedo (durante o transporte de cerveja ou durante armazenamento inadequado) e outras modificações aparecem depois de semanas ou até mesmo depois de meses de armazenamento. Mesmo que não haja uma percepção de paladar das alterações no sabor da cerveja, a sua composição química muda (por exemplo, no caso de polifenóis ou melanoidina) (Gresser, 2009). Deste modo, o tempo de armazenamento tem influência na estabilidade da cerveja. Na cerveja artesanal, pelo facto de não se realizarem as etapas de filtração e pasteurização, é essencial haver um controlo rigoroso de diversos fatores, tanto na produção como no armazenamento, de modo a prevenir o aparecimento de alterações na estabilidade e consequente qualidade da cerveja.

### 1.3.1. Temperatura

A temperatura é um factor que tem uma elevada influência na estabilidade da cerveja durante o armazenamento devido a fenómenos de oxidação. O armazenamento de cervejas a temperaturas elevadas tem grande influência no sabor da cerveja, levando a alterações prejudiciais nas suas propriedades (Malfliet *et al.*, 2008). A temperatura afeta diretamente a formação ou a degradação de metabolitos associados ao aroma e sabor (Gresser, 2009) tais como: álcoois superiores, melanoidinas, aminoácidos, ácidos gordos, resinas de lúpulo, carbonilos, ésteres e compostos contendo sulfatos, levando à ocorrência de oxidações e consequente aparecimento de turvação. Deste modo, para as cervejas artesanais que são mais propícias a fenómenos de oxidação, são recomendadas temperaturas de armazenamento mais baixas (4°C) para melhorar a estabilidade da cerveja que se encontra armazenada (Heuberger, *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Garrafa de vidro

Devido à sua elevada resistência mecânica, o vidro proporciona excelente proteção contra a difusão de gases, tais como o O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, de dentro para fora da garrafa e vice-versa. Esta propriedade de barreira é particularmente importante no caso da cerveja, pois esta tem tendência a oxidar após um longo período de armazenamento.

Além disso, o vidro é inerte e não absorve nem liberta quaisquer constituintes para a cerveja assumindo-se assim, que não existe qualquer interação entre o vidro e a cerveja permanecendo com a qualidade desejada durante o período de armazenamento.

Por uma questão de marketing, são utilizadas garrafas de vidro transparentes, no entanto, a sua utilização acarreta desvantagens quanto à proteção contra a luz. A cerveja é muito sensível à luz e quando exposta a gamas de radiação UV de 350-500 nm pode levar a uma alteração indesejada no sabor e aroma da cerveja devido à ocorrência de reações químicas e consequente formação do composto 3-metil-2-buten-1-ol (*MBT*) e ocorrência de fenómenos de oxidação, que leva ao aparecimento de turvação na cerveja (Stewart, 2006). Deste modo, as garrafas mais escuras são aquelas que proporcionam uma melhor proteção contra a luz retardando a ocorrência de oxidações (Bluml, 2009).

### 1.3.3. Colas de estabilização

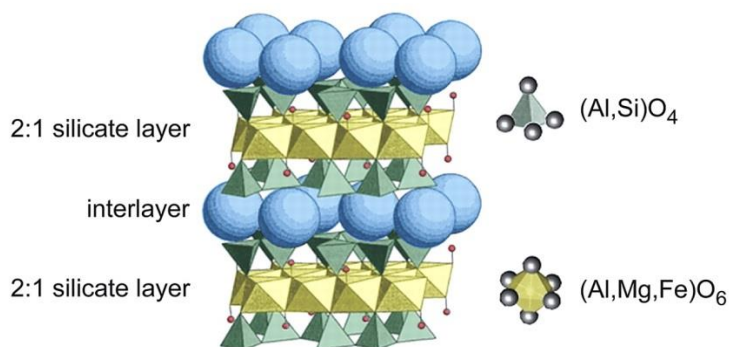
Para garantir a estabilidade coloidal em cervejas destinadas aos mercados nacionais ou mesmo internacionais, com longos tempos de distribuição, esta pode ser estabilizada utilizando diferentes técnicas de adsorção/precipitação, atuando em taninos, proteínas, hidratos de carbono, oxigênio e metais pesados (podem conferir sabores indesejáveis à cerveja) e confere cor mais clara à cerveja (Lewis e Young, 1995).

Atualmente, existe uma vasta gama de colas de estabilização disponíveis no mercado, tais como: PVPP, bentonite, sílica, gelatina, colas de peixe, entre outras, variando a sua aptidão para absorver proteínas de tamanhos diferentes (Gresser, 2009).

**Bentonite:** É uma das argilas mais utilizadas na indústria cervejeira devido ao seu poder adsorvente e propriedades físico-químicas únicas (Ryder e Power, 2006). As principais características da bentonite são: grande área de superfície quimicamente ativa, elevada capacidade de permuta de cátions e superfícies com características de hidratação única (Hosterman e Patterson, 1992). De modo a entender o mecanismo de atuação da bentonite no tratamento de cerveja, é importante ter mais informação sobre a sua estrutura e como esta influencia as suas propriedades físico-químicas.

A bentonite é comercializada na forma liofilizada sendo constituída por duas unidades estruturais, e cada unidade composta por duas folhas tetraédricas e uma folha octaédrica no centro. As folhas tetraédricas contêm cátions alumínio (Al) e as suas extremidades estão apontadas uma à outra. Estas extremidades contêm aniões de oxigênio (carga negativa) que também fazem parte da folha octaédrica que é composta principalmente por alumínio (Al), ferro (Fe) e magnésio (Mg) (Ryder e Power, 2006).

Uma unidade estrutural é dipolar: positiva nas bordas externas e negativa na superfície plana. Entre duas unidades estruturais individualizadas, existe uma intercamada com cátions sódio (Na) que têm afinidade para a superfície plana negativa destas estruturas (Hosterman e Patterson, 1992).



**Figura 11** - Composição estrutural da bentonite. Retirado de (Hosterman e Patterson, 1992)

Quando hidratada, a bentonite é penetrada por moléculas de água no espaço intercamada, onde os cátions sódio ( $\text{Na}^+$ ) hidratam e consequentemente dissociam-se da superfície da unidade estrutural. Deste modo, as cargas negativas da unidade estrutural vão se repelir, tornando-se identidades individuais. Consequentemente, vai ocorrer uma atração entre os cátions de hidrogénio (H) da molécula de água e os aniões de oxigénio (O) das folhas tetraédricas formando uma estrutura hexagonal.

A bentonite atua sobre as proteínas carregadas positivamente presentes na cerveja devido a forças atrativas e de adsorção como forças de van der Waal. Cada unidade estrutural de bentonite tem características hidrofóbicas o que leva a que esta flocule e decante. Além disso, a bentonite tem a capacidade adicional de envolver estas proteínas por retenção física. Durante o armazenamento da cerveja, após uma grande parte da bentonite ter assentado no fundo do fermentador, esta é removida por decantação e de seguida realiza-se a filtração da cerveja.

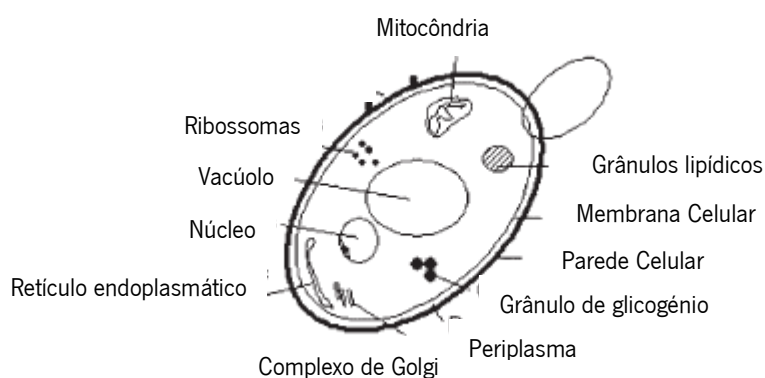
Na indústria das bebidas alcoólicas, como é o caso do vinho, as concentrações de bentonite usadas variam entre 0,10-1,00 g/L (Navarre e Langlade, 2002). Na indústria cervejeira, as concentrações usadas estão compreendidas entre 0,40 e 1,00 g/L, dependendo do tipo de cerveja que se pretende clarificar (Ryder e Power, 2006).

#### 1.3.4. Levedura

As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos e apresentam um metabolismo fermentativo anaeróbio, essencial para a produção de etanol e dióxido de carbono, e um metabolismo respiratório aeróbio que favorece a produção de biomassa (Gancedo e Serrano,

1989). Morfologicamente, as leveduras são, na grande maioria, redondas ou ovais e por vezes de formato elíptico ou cilíndrico. A célula tem uma dimensão entre 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 3 a 10  $\mu\text{m}$  de largura e 4 a 14  $\mu\text{m}$  em comprimento. As células de levedura contêm os organelos típicos de uma célula eucariótica. A Figura 12 ilustra os organelos mais importantes da levedura (Tenge, 2009).

As leveduras utilizadas na produção de cerveja são geralmente de dois tipos: de fermentação alta ou *ales* (*Saccharomyces cerevisiae*) e de fermentação baixa ou *lager* (*Saccharomyces carlsbergensis*) (Geiser, 2002). Estes dois tipos de levedura diferem, principalmente, na temperatura de fermentação e na forma de floculação, onde as leveduras do tipo *lager* fermentam entre 7-15 °C e são recolhidas na base do fermentador, por outro lado as leveduras do tipo *ale* fermentam entre 18-25 °C e flutuam, podendo ser recolhidas no topo do fermentador (Tenge, 2009). A fermentação corresponde a um conjunto de processos bioquímicos complexos que envolvem: (1) captação e metabolismo de açúcares, aminoácidos, péptidos, lípidos e outras moléculas; (2) conversão anaeróbia dos açúcares a etanol e dióxido de carbono; (3) formação de ácidos e remoção de tampões, reduzindo o pH; (4) incorporação do CO<sub>2</sub> natural na cerveja; (5) produção de compostos tais como os álcoois superiores e ésteres que são benéficos para o aroma da cerveja e produção de ácidos gordos que prejudicam o aroma da cerveja (*off-flavours*). Além destes compostos, o metabolismo da levedura contribui ainda com três grupos de compostos químicos, tais como ácidos orgânicos, compostos sulfúricos e aldeídos (Pires *et al.*, 2014). Estes compostos produzidos pela levedura afetam o sabor, aroma e o odor da cerveja final. Deste modo, é essencial controlar a quantidade de levedura utilizada na fermentação primária e certificar que fica retida na garrafa uma reduzida quantidade da mesma, visto que a cerveja artesanal não é pasteurizada nem filtrada, evitando o excesso destes constituintes.



**Figura 12**-Ilustração transversal da levedura e os seus organelos principais (Tenge, 2009)



As leveduras são compostas maioritariamente por água. Os outros compostos minoritários são: hidratos de carbono, proteínas e ácidos nucleicos, que formam uma vasta gama de compostos orgânicos de baixo peso molecular, e iões inorgânicos (Slaughter, 2003).

A Tabela 2 mostra os principais compostos químicos principais da célula de levedura.

**Tabela 2**-Composição química das leveduras em peso seco (%). Adaptada de Anger e Kruger (1990)

| <b>Compostos químicos</b>      | <b>%</b> |
|--------------------------------|----------|
| cinzas/compostos não orgânicos | 8-9      |
| compostos azotados             | 45-60    |
| gordura total                  | 1,2-12   |
| Hidratos de carbono totais     | 10-30    |
| Glicogénio                     | 28-43    |

#### *1.3.5. Higienização*

Os resíduos produzidos pela indústria alimentar são meios nutricionais ideais para diversos microrganismos. Se de um modo geral estes resíduos são necessários para a produção de diversos alimentos, também podem causar a deterioração destes e até levar ao possível envenenamento do ser humano. Assim sendo, na indústria cervejeira devem ser tomadas medidas de higiene e segurança alimentar, tais como a limpeza e desinfeção, com auxílio de agentes de limpeza e desinfetantes de modo a evitar possíveis contaminações microbiológicas (Praeckel, 2009).

A desinfeção pode ser de dois tipos, ação física e ação química. Na indústria cervejeira, a desinfeção é aplicada a materiais, superfícies e equipamentos. Os agentes físicos envolvem tratamentos térmicos, UV, raios-X.

As desinfeções usando agentes químicos é feita com base no seu espectro de atividade e adequação para diferentes processos alimentares (Orth, 1998).

Os agentes químicos de desinfeção devem ter as seguintes características:

- Vasta gama de eficácia microbicida;
- Eficácia a baixa temperatura;
- Estabilidade durante o seu armazenamento;
- Compatibilidade com superfícies, materiais e equipamentos para evitar corrosões;
- Económico e respeito pelo ambiente;

- Eficácia sob cargas orgânicas.

Na indústria de produção de cerveja, são utilizados diferentes agentes de desinfecção. Na Tabela 3 são mencionados alguns agentes de desinfecção.

**Tabela 3**-Representação de agentes de desinfecção utilizados na indústria cervejeira. Adaptado de Praeckel (2009) e Orth (1998)

| <b>Agentes desinfetantes</b>     | <b>Vantagens</b>  | <b>Desvantagens</b>  | <b>Locais de utilização</b>   |
|----------------------------------|---|--|---|
| Substâncias contendo cloro ativo | Efeito oxidante<br>Ampla gama de eficácia                                     | Perigo de formação de clorofenol<br>(afeta negativamente o sabor da cerveja) | Cubas de fermentação<br>Lavagem de barril e garrafas<br>Máquina de enchimento e tubagem |
| Agentes oxidantes                | Ampla gama de eficácia<br>Utilização em materiais vedantes<br>Efeito oxidante | Oxida-se em contato prolongado com o ar                                      | Tanques, tubagens e mangueiras<br>Lavagem de garrafas<br>Cervejaria em geral            |
| Dióxido de cloro                 | Efeito oxidante<br>Custos operacionais económicos<br>Elevada gama de eficácia | Necessário misturar dois componentes<br>Elevado custo de investimento        | Lavagem de garrafas   |
| Ácido carboxílicos halogenados   | Agente ácido<br>Ampla gama de eficácia<br>Poder desinfetante e de limpeza     | Elevada toxicidade<br>Necessário combinar com um ácido inorgânico            | Tanques e tubagens  |

Atualmente, as indústrias de bebidas utilizam agentes de desinfecção que contêm cloro ativo. Geralmente, estes produtos possuem na sua constituição hipoclorito de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de sódio.

No entanto a sua utilização apresenta algumas desvantagens, tais como: o risco de corrosão de superfícies constituídas por aço, níquel ou alumínio, devido ao nível de acidez; diminuição da eficácia do agente se ocorrer uma contaminação orgânica devido à degradação do cloro; produtos à base de cloro são instáveis a temperaturas elevadas (acima de 40 °C); produtos que contêm cloro ativo podem formar clorofenóis devido a reações com substâncias orgânicas alterando prejudicialmente a experiência sensorial da cerveja.



## **2. Enquadramento do trabalho na empresa de acolhimento**

### **2.1. A empresa - *Fermentum***

A empresa Fermentum-Engenharia das Fermentações, Lda (2011) é uma empresa de base tecnológica e está sediada no concelho de Vila Verde desde Julho de 2013. Esta empresa é uma *spin-off* da Universidade do Minho desde 2012 e os fundadores desta empresa são os Engenheiros Filipe Macieira e Francisco Pereira, ambos ex-alunos do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Apesar de a fábrica só ter sido inaugurada no fim do Verão de 2013, a ideia sobre a produção de cervejas artesanais já vinha a crescer desde o período do estágio de Mestrado em Engenharia Biológica em 2008, onde ambos os fundadores tiveram projetos associados ao ramo cervejeiro e adquiriram saberes técnicos e científicos. Deste modo, a ideia associada ao desenvolvimento de cervejas diferentes das produzidas e consumidas até então no mercado nacional surgiu de uma forma natural sendo materializada num plano de negócios coerente e realista. Assim, surge a LETRA – Cerveja Artesanal Minhota.

### **2.2. O produto - Cerveja LETRA**

A LETRA-Cerveja Artesanal Minhota, assume-se como representante do Minho, estando a própria marca associada à região. Trata-se de uma cerveja produzida através de métodos de fabrico artesanais e ingredientes 100% naturais, tais como: água, maltes e lúpulos. Ao contrário da produção industrial de cerveja, a cerveja LETRA não sofre qualquer filtração após a fermentação mas sim apenas uma decantação e não sofre pasteurização, nem utiliza aditivos durante o processo de fabrico. Devido a estas alterações no processo de fabrico e à qualidade das matérias-primas usadas fazem com que a cerveja artesanal tenha um sabor muito mais intenso e muito mais aromático, o que lhe conferem um carácter único e especial.

A Cerveja LETRA apresenta no mercado 4 cervejas base: LETRA A (Weiss-trigo), LETRA B (Pilsner-loira), LETRA C (Stout-preta) e LETRA D (Red Ale-ruiva) como se pode observar na Figura 13.



**Figura 13-**Cervejas *LETRA*

Além das 4 *LETRAS* base A, B, C e D, já existem 2 cerveja especiais: *LETRA E (Belgian Dark)* e a *LETRA F (IPA-Indian Pale Ale)*. Espera-se dar continuidade à produção de outras cervejas especiais, originando novas “*LETRAS*” e desta forma, seguir a filosofia da *LETRA*. A estratégia dinâmica da marca tem como objetivo interagir com os consumidores de forma didática. Com a implementação da *LETRA* no mercado nacional e posteriormente internacional, esta vai atrair turistas portugueses e estrangeiros ao seu espaço de produção, trazendo riqueza e notoriedade à região.

### 3. Objetivo

O objetivo central deste trabalho é avaliar a influência de um conjunto de variáveis num lote de cerveja do tipo *Pilsner* de modo a entender quais os parâmetros que influenciam a estabilidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira e definir estratégias de otimização a serem implementadas no processo cervejeiro por forma a melhorar a estabilidade sensorial deste tipo de produtos com o tempo.

#### 3.1. Objetivos específicos

Numa primeira fase, pretende-se identificar as variáveis que afetam, positiva ou negativamente, a estabilidade da cerveja engarrafada ao longo do tempo de prateleira. As variáveis introduzidas nesta experiência foram:

- Adição de Levedura ( $C=0,50$  g/L)
- Desinfecção das garrafas com P3 Asepto-2000 (2%)
- Uso de cola de estabilização (bentonite,  $C=0,60$  g/L)
- Garrafas de diferentes cores (âmbar, transparente e verde)
- Temperatura de armazenamento ( $4^{\circ}\text{C}$ )

Numa segunda fase, após a seleção das variáveis a introduzir na atividade experimental, foram efetuadas as seguintes tarefas:

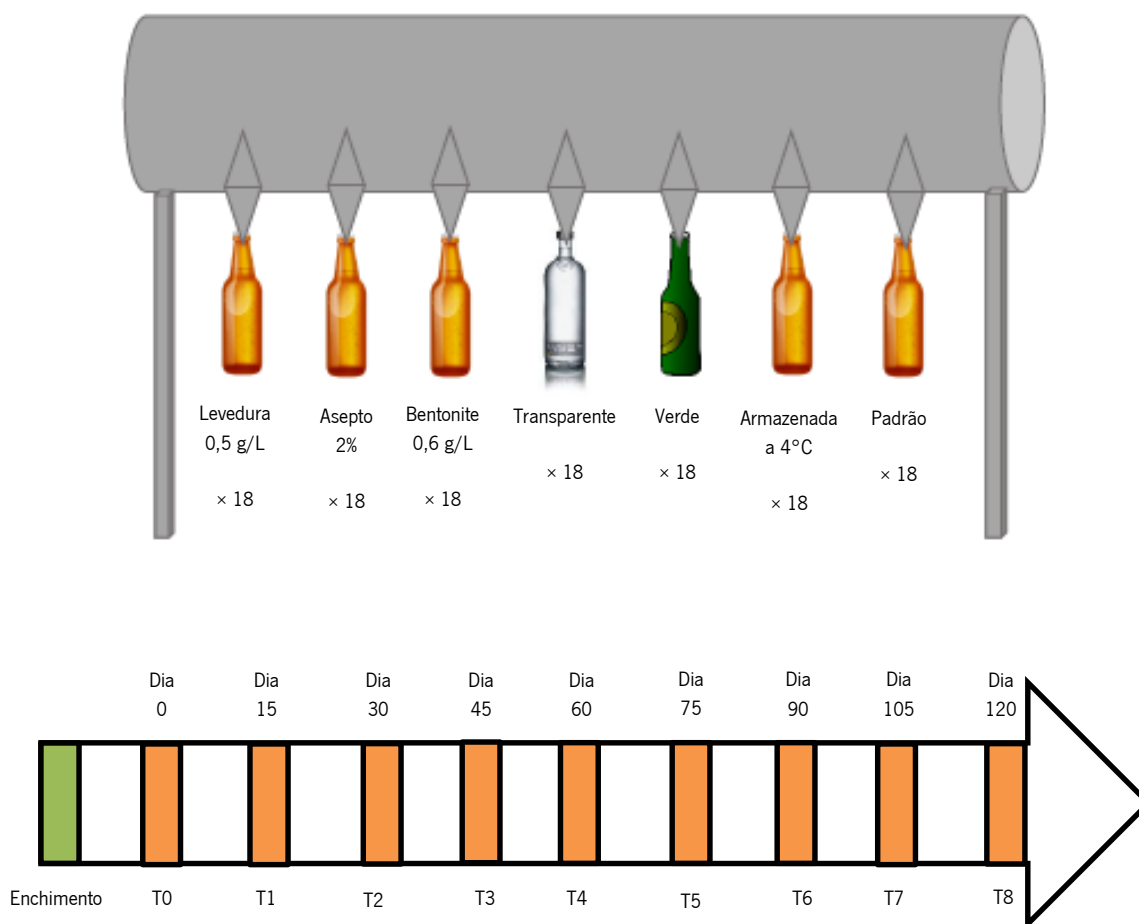
- Produzir um lote de cerveja *Pilsner*.
- Realizar o processo de enchimento e introduzir as variáveis escolhidas na cerveja a engarrafar.
- Monitorizar o produto ao longo do tempo, quantificando um conjunto de parâmetros físico-químicos, tais como: pressão interna, pH, Brix, condutividade, % de sal, estabilidade da espuma, cor e turvação.
- Elaborar perfis de cada parâmetro ao longo do tempo e determinar as alterações favoráveis, passíveis de serem introduzidas no processo cervejeiro.





## 4. Materiais

Esta experiência teve início a 8 de Maio de 2014 e teve uma duração de 120 dias. No início da atividade experimental procedeu-se ao enchimento da cerveja LETRA B *Pilsner* do tipo *lager*. Utilizou-se o mesmo lote de cerveja durante toda a experiência. Procedeu-se, assim, ao estudo da influência das variáveis abaixo discriminadas na qualidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira. As primeiras amostras analisadas, correspondentes ao T0, tiveram início no dia 19 de Maio de 2014.



**Figura 14-** Esquema da frequência da amostragem da experiência . Foram retiradas amostras de 15 em 15 dias (T0 a T8), para análise de todos os parâmetros. As amostras T0 e T7 foram analisadas por via HPLC e GC-MS para quantificação de compostos minoritários

\* ×18-Número total de garrafas usadas em cada variável

**Levedura:** A levedura utilizada nesta experiência foi a *Safbrew S-33*. Esta é produzida pela empresa *Fermentis* e comercializada na forma liofilizada. Utilizou-se levedura liofilizada de modo a garantir que a mesma concentração de levedura estivesse nas garrafas nas diferentes amostras. Esta tarefa experimental teve como propósito, avaliar possíveis alterações físico-químicas que ocorrem em cerveja, introduzindo uma concentração elevada de levedura (0,50 g *Lev. seca.* /L) (Fillaudeau e Carrère, 2002). Nesta atividade experimental foram utilizadas 18 garrafas, às quais se adicionou uma concentração de levedura de 0,50 g *Lev. seca.* /L. Para obter esta concentração de levedura seca foi necessário pesar 0,00165 g. Para o efeito, recorreu-se a uma balança digital (Mettler AE 200), com um erro aproximado de 0,00001. Da garrafa 1-6 procedeu-se à adição da levedura antes do enchimento. No momento do enchimento verificou-se uma elevada formação de espuma perdendo-se assim um elevado volume de cerveja. Deste modo, da garrafa 7-18 optou-se pela colocação da levedura após o enchimento da garrafa verificando-se uma redução considerável da espuma e um volume de cerveja mais próximo de 0,33 L.

**Higienização:** Recorreu-se ao desinfetante P3 Asepto-2000 (ECOLAB). Este desinfetante é um produto de limpeza alcalino clorado muito utilizado na indústria alimentar. Este desinfetante foi utilizado para higienizar as garrafas e analisar possíveis alterações nos parâmetros da cerveja. Deste modo, colocaram-se 18 garrafas num balde com 40 L de água à temperatura ambiente e P3-Asepto 2000 numa concentração de 2%, ou seja, 0,8 L deste desinfetante. As garrafas estiveram submersas nestas condições durante 12 horas. Após as 12 horas, as 18 garrafas foram passadas por água fria uma única vez. No momento do enchimento, as garrafas estavam secas.

**Cola estabilizadora:** A utilização da bentonite, na forma liofilizada, teve como objetivo analisar a clarificação e estabilidade da cerveja artesanal.

Nesta atividade experimental foram utilizadas 18 garrafas, às quais se adicionou uma concentração de bentonite de 0,60 g/L. A escolha desta concentração teve em conta valores encontrados na bibliografia. As concentrações de bentonite estão compreendidas entre 0,40 e 1,00 g/L, dependendo do tipo de cerveja que se pretende clarificar (Ryder e Power, 2006); (Navarre e Langlade, 2002). Foi necessário utilizar uma balança digital de modo a pesar 0,00198 g de bentonite liofilizada para obter esta concentração. Optou-se por adicionar a bentonite à garrafa, após o seu enchimento.

**Garrafas de cor:** Foram utilizadas três tipos de garrafas com cor diferente de modo a analisar possíveis alterações das propriedades físico-químicas na cerveja ao longo do tempo de prateleira. Utilizaram-se 18 garrafas de cor âmbar de 0,33 L utilizadas pela empresa Fermentum na comercialização da sua cerveja, 18 garrafas de cor “transparente” de 0,25 L e 18 garrafas de cor verde de 0,25 L. (Mesmo sabendo que os formatos da garrafa podiam alterar os resultados, não foram encontradas garrafas iguais).



**Figura 15**-Três tipos de garrafas utilizadas na experiência

#### 4.1. Métodos

**Temperatura de armazenamento das amostras:** Com recurso a um termómetro de contato de superfície mediu-se a temperatura das garrafas diariamente ao início do dia (9:00h) e ao final do dia (19:00h) e registou-se o valor numa tabela com o dia, hora de registo correta e valor em °C da temperatura.

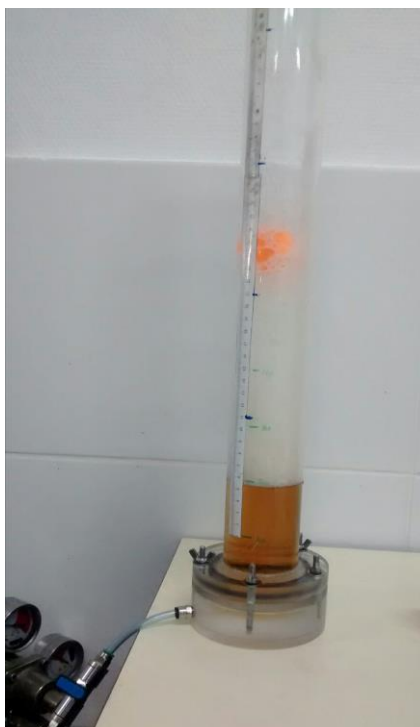
**Pressão Interna da garrafa:** A análise da pressão interna realizou-se com um aparelho munido de um manómetro que perfura a cápsula e mede a pressão no *head-space* da garrafa. Este aparelho foi fornecido pela empresa *CESPEDES* (Figura 16).



**Figura 16**-Aparelho de medição da pressão interna da garrafa

Fixou-se o equipamento à parte superior da garrafa de 0,33 L de modo a perfurar a carga. De seguida empurrou-se o manípulo de modo a perfurar a carga. Após a perfuração da carga, registou-se o valor obtido no manómetro de pressão.

**Análise da espuma:** A análise da espuma realizou-se recorrendo ao método de *Rudin* usando um *Foam-Analyzer (FA)* construído em acrílico com difusor na base para injeção de  $\text{CO}_2$ . Este consistiu na medição do tempo que a espuma demora a colapsar ao longo do comprimento do *(FA)* (com marcações de 10 em 10 cm de altura).



**Figura 17**-Equipamento de medição da espuma - *Foam-Analyzer*

Abriu-se a garrafa de cerveja e colocou-se suavemente 20 cl de cerveja diretamente da garrafa para o interior do *FA*, evitando assim, a formação de espuma. De seguida injetou-se  $\text{CO}_2$  à pressão constante de 0,2 bar de modo a converter a amostra de cerveja em espuma. Este gás foi injetado pelo difusor, promovendo a formação de espuma até ao topo do *FA*. O tempo que demorou a atingir o topo do *FA* foi cronometrado e devidamente registado numa tabela.

No momento em que a espuma atinge o topo do reator, fecha-se a válvula de fornecimento de gás e colocou-se um corpo esférico e oco em suspensão na espuma, e à medida que este corpo ia descendo pelo comprimento do *FA* foram registados os valores de tempo correspondentes à distância percorrida de 10 em 10 cm.

No final da medição da espuma, retirou-se uma porção de amostra do *FA* para determinação do pH, brix, condutividade e % sal e para leitura no espectrofotómetro. Após esta quantificação, a amostra foi devidamente congelada para posterior análise em HPLC e GC-MS.

**Análise do Brix:** Realizou-se com um refratómetro digital MA871 da *Milwaukee* (Figura 18) que faz o ajuste automático do grau brix mediante a temperatura da amostra. O grau brix fornece o conteúdo de sólidos solúveis em solução aquosa (Kleinhenz, 2012). No caso das cervejas, o composto solúvel maioritário em solução é o açúcar, logo o grau brix vai fornecer o conteúdo de

açúcar presente em solução (Mignani, 2013). A análise do grau brix é realizada para controlar a fermentação (Castritius, 2010). Assim sendo, em 100 g de solução que mede 50 °Brix tem 50 g de açúcar e outros sólidos dissolvidos e 50 g de água (Kleinhenz, 2012).



**Figura 18-** Aparelho de medição do Brix

O método de medição do grau Brix iniciou-se com a respectiva calibração do medidor, usando água destilada e marcando o zero. Após a calibração do aparelho, retirou-se uma porção de amostra e cobriu-se a célula do medidor do grau Brix realizando a leitura e registrando o valor na tabela.

**Análise do pH:** Realizada com o recurso a um medidor de pH (Figura 19). O pH de uma solução indica o grau de acidez ou alcalinidade relativa para a ionização da amostra de água. A medição do pH consiste em comparar o potencial das soluções com a concentração de  $[H^+]$  a um potencial de referência conhecido.



**Figura 19-** Aparelho de medição do pH

Inicialmente ligou-se o aparelho de medição do pH IP-57 da marca *ALLAFRANCE* (Figura 19) e procedeu-se à sua calibração, usando soluções-tampão adequadas e seguindo as instruções do fornecedor descritas no manual. Em seguida, agitou-se o frasco da amostra de modo a remover o CO<sub>2</sub> dissolvido da cerveja para não influenciar a leitura do pH, e registou-se o valor obtido na tabela.

**Condutividade e % de sal:** A medição da condutividade e da % de sal da cerveja realizou-se com o auxílio do aparelho de medição PHD-1 da marca *PCE*. Este aparelho faz a leitura dos dois parâmetros.

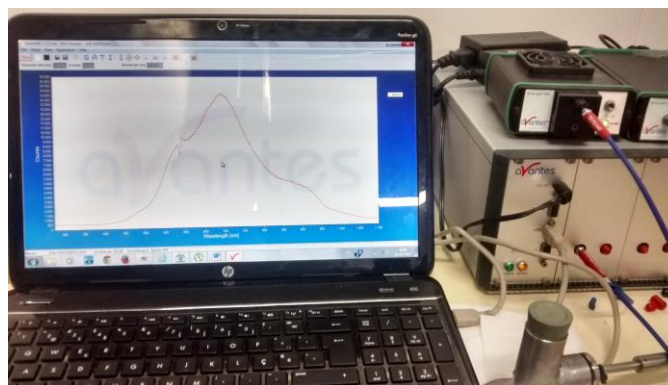


**Figura 20-**Aparelho de medição da condutividade e % de sal

Inicialmente, ligou-se o aparelho e inseriu-se a sonda que mede a condutividade e a % de sal efetuando-se as respetivas medições, registando-se os valores numa tabela.

**Análise da cor e turvação:** A avaliação realizou-se com recurso a um equipamento de fibras óticas da *AVANTES* e uma fonte de luz de halogénio da mesma marca.





**Figura 21**-Espectrofotômetro da *AVANTES*

De início ligou-se a fibra (LS) à fonte de luz de halogénio e fibra com sinal de resposta. Seguidamente, ligou-se a fonte de Luz e o espectrofotômetro e iniciou-se o *Software AVANTES*, clicando em *START* e integrou-se o espectro para calcular o tempo de integração (*Autoconfigure Integration Time*). De seguida, desligou-se a fonte de luz e gravou-se o *Dark (Save Dark)* e no menu *Setup* subtraiu-se o Dark (*Subtract saved Dark*). Após a subtração do *Dark*, ligou-se novamente a fonte de luz e o sistema ficou pronto a recolher os espectros. Para recolher os espectros, seleccionou-se o menu *File-> Start New Experiment* e definiu-se a pasta onde os espectros iam ser gravados, definindo um nome para a experiência (ex: BTxVyRz). Por fim, seleccionou-se o menu *SetUP-> Options-> Supress Save Comment Dialogs* e novamente *SetUP-> Options -> Autosave Spectra Periodically* de modo a guardar os espectros na pasta escolhida anteriormente. Em *Autosave Spectra Periodically* optou-se por um *Time Dellay= 2; Time between Delay=2; Number of Scans=10*.

Após a análise das amostras de cerveja, os 14 frascos de amostra foram colocados numa arca frigorífica para conservação e posterior análise.

### **Quantificação de compostos maioritários – HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*):**

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) consiste num processo de separação em que a amostra é arrastada por um eluente líquido (fase móvel) através de um adsorvente também líquido (fase estacionária) que reveste um suporte sólido inerte finamente dividido. Os componentes da amostra migram através da coluna a diferentes velocidades devido à sua solubilidade, tamanho, carga, afinidade e polaridade.

O etanol, o glicerol e os hidratos de carbono (glucose, maltose e frutose) foram quantificados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), usando um cromatógrafo (*Jasco*) equipado com um detector (*Jasco 830-RI*) de refração index (*RI*), um detetor de UV-visível (*Jasco 870-UV-visível*) e uma coluna *87 H Chrompack* (7,8 mm × 300 mm) a 60°C. Foram utilizados 5 mmol/L de ácido sulfúrico como eluente, a um caudal de 0,7 mL/min e um volume de 20 µL.

Os ácidos orgânicos (succínico, málico, cítrico, láctico e acético) foram quantificados pelo mesmo equipamento, mas a coluna foi utilizada a uma temperatura de 80°C e o eluente a um caudal de 0,5 mL/min.

O etanol, o glicerol e os hidratos de carbono foram identificados utilizando um detetor RI. O detetor de UV-visível foi utilizado na identificação dos ácidos orgânicos com um comprimento de onda de 210 nm.

#### Químicos e reagentes:

| Compostos       | fornecedor     | cat. N <sup>o</sup> | Pureza, p/% |
|-----------------|----------------|---------------------|-------------|
| Etanol          | Fisher         | 64-17-5             |             |
| Glicerol        | Himedia        | 56-81-5             | 99,5        |
| Glucose         | Fisher         | 50-99-7             |             |
| Frutose         | Panreac        |                     | 98          |
| Maltose         | Fisher         | 6363-53-7           |             |
| Ácido sulfúrico |                |                     |             |
| Ácido tartárico | Sigma          | 87-69-4             | 99,5        |
| Ácido málico    | Acros Organics | 97-67-6             | 99          |
| Ácido láctico   | Fluka          | 79-33-4             | 85-90       |
| Ácido fumárico  | Fluka          | 110-17-8            | ≥99         |
| Ácido acético   | Sigma          | 64-19-7             |             |
| Ácido cítrico   | Panreac        |                     | 99,5        |

#### Extração dos compostos voláteis:

Num tubo de cultura de 10 ml (Pyrex, ref.1636/ 26MP), adicionou-se 8 ml da solução preparada, a 100 µl de padrão interno (4-nonanol, Merck ref. 818773) e uma barra de agitação magnética (22,2 mm x 4,8 mm).

A extração foi realizada por agitação da amostra com 400 mL de diclorometano (Merck, ref. 1,06050) durante 15 min, com recurso a um agitador magnético. Após o arrefecimento a 0 ° C durante 10 min, a barra de agitação magnética foi removida e a fase orgânica foi isolada por centrifugação (RCF = 4000, 7 min, 7°C), sendo o extrato recuperado num frasco, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. De seguida, realizou-se a secagem do extrato aromático com sulfato de sódio anidro (Merck, ref. 1,06649) e recolheu-se novamente para um novo frasco. Cada solução foi extraída em triplicado.

### **Quantificação de compostos minoritários voláteis - GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrography):**

A cromatografia de gás (GC-MS) é utilizada para separar os compostos voláteis de uma mistura. Os compostos separados podem ser identificados e quantificados.

Para conseguir a identificação de compostos diferentes, três passos podem ser distinguidos num sistema de GC-MS, tais como: injeção, separação e deteção.

A análise dos compostos voláteis foi realizada com recurso a um equipamento GC-MS. Este era constituído por uma cromatógrafo *Varian 3400* e um espectrófotometro de massa (*ion-trap*) *Varian Saturn II*. Injetou-se 1 µl de amostra numa coluna capilar, revestida com um *CP-Wax 52 CB* (50 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,2 µm, *Chrompack*). A temperatura do injetor (*SPI*) foi programada de 20°C a 250°C, a 180°C/min. A temperatura do forno foi mantida a 40°C, durante 5 min. De seguida, programou-se a temperatura para aumentar de 40°C a 250°C, a 3°C/min. Após 20 min a 250°C, programou-se a temperatura para aumentar de 250°C a 255°C a 1°C/min. O gás transportador utilizado foi o hélio N60 (Ar líquido) a 103 kPa, correspondendo a uma velocidade linear de 15,5 cm/s a 150°C. O detetor foi ajustado para o modo de impacto eletrónico (70 eV), com um intervalo de aquisição de 29 m/z-360 a m/z, e uma taxa de aquisição de 610 ms.

## 5. Apresentação e discussão dos resultados

### 5.1. Reprodutibilidade das medidas efetuadas

Para a avaliação da reprodutibilidade das medidas efetuadas, foram avaliados os diferentes parâmetros (pressão interna, pH, brix, condutividade, % de sal e estabilidade da espuma em cinco amostras independentes ( $n=5$ ) da cerveja Standard. Através da análise da Tabela A. 1, Tabela A. 2, Tabela A. 3, Tabela A. 4, e Tabela A. 5 em anexo, verificou-se que a variabilidade das medidas é muito reduzida no âmbito das condições da experiência realizada. Como se pode verificar na Tabela A. 1. em anexo, analisando a amostra Standard 1, os triplicados técnicos dos diferentes parâmetros apresentaram uma variabilidade muito reduzida. No caso do parâmetro “pressão interna” obteve-se valores de  $1,7 \pm 0,0$  bar, o que se traduz numa variação de 0,6 % sendo um indicador da reprodutibilidade do método nas diferentes medições.

Através da análise da Tabela 4 e Tabela 5, foi possível demonstrar a reprodutibilidade do método entre as cinco amostras biológicas independentes. Assim, para a propriedade pressão interna, brix, pH, condutividade e % de sal verificou-se uma variação percentual de 4,1, 0,9, 0,2, 2,05 e 3,00 % respetivamente. Deste modo, verificou-se uma variação percentual inferior a 4,1 % , o que é indicador da reprodutibilidade do método nos vários ensaios realizados para as diferentes amostras.

Deste modo, foi possível concluir que o método tem uma boa reprodutibilidade.

**Tabela 4-**Avaliação da reprodutibilidade do método entre as cinco amostras biológicas independentes ( $n=5$ ) através da medição da média, desvio-padrão e variação percentual

| <b>Cerveja Standard</b> | <b>Pressão Interna</b> | <b>Brix</b>  | <b>pH</b> | <b>Condutividade</b> | <b>% Sal</b> |
|-------------------------|------------------------|--------------|-----------|----------------------|--------------|
| <b><i>n</i></b>         | <b>bar</b>             | <b>°brix</b> | <b>-</b>  | <b>mS/m</b>          | <b>%</b>     |
| <b>1</b>                | 1,7                    | 5,1          | 4,0       | 1,74                 | 0,10         |
| <b>2</b>                | 1,6                    | 5,1          | 4,0       | 1,78                 | 0,10         |
| <b>3</b>                | 1,8                    | 5,1          | 4,0       | 1,78                 | 0,10         |
| <b>4</b>                | 1,7                    | 5,0          | 4,0       | 1,74                 | 0,10         |
| <b>5</b>                | 1,6                    | 5,0          | 4,0       | 1,83                 | 0,10         |
| <b>Média</b>            | 1,7                    | 5,1          | 4,0       | 1,77                 | 0,10         |
| <b>Desvio-Padrão</b>    | 0,1                    | 0,0          | 0,0       | 0,04                 | 0,00         |
| <b>Variação %</b>       | 4,1                    | 0,9          | 0,2       | 2,05                 | 3,00         |

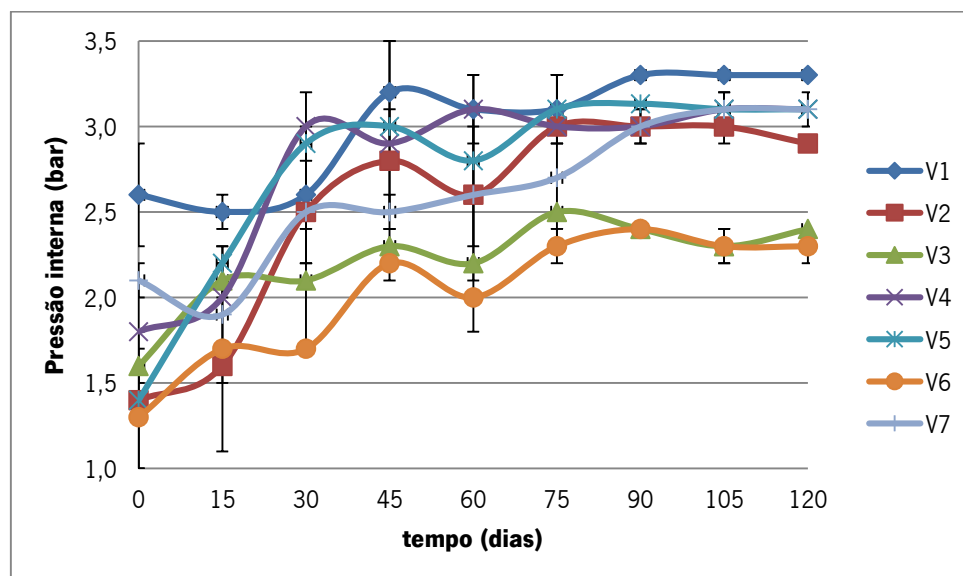
Através da observação da Tabela 5 verificou-se que entre as cinco amostras independentes, a velocidade de degradação da espuma teve uma % de variação de 3,5 %.

**Tabela 5**-Avaliação da reprodutibilidade do método entre as cinco amostras biológicas independentes (n=5) para a análise da velocidade de degradação da espuma através da medição da média, desvio-padrão e respetiva variação percentual.

|                               | Teste    | Velocidade de<br>degradação Espuma |
|-------------------------------|----------|------------------------------------|
|                               |          | mm/seg                             |
| <b>Cerveja<br/>Standard 1</b> | <b>1</b> | 0,6                                |
| <b>Cerveja<br/>Standard 2</b> | <b>1</b> | 0,5                                |
| <b>Cerveja<br/>Standard 3</b> | <b>1</b> | 0,5                                |
| <b>Cerveja<br/>Standard 4</b> | <b>1</b> | 0,6                                |
| <b>Cerveja<br/>Standard 5</b> | <b>1</b> | 0,6                                |
| <b>Média</b>                  | <b>1</b> | 0,6                                |
| <b>Desvio-Padrão</b>          |          | 0,0                                |
| <b>Variação %</b>             |          | 3,5                                |

## 5.2. Pressão interna

Ao analisar o gráfico da Figura 22, verificou-se um aumento da pressão interna da garrafa ao longo do tempo.



**Figura 22-** Representação gráfica da variação da pressão interna para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Observando o gráfico da Figura A. 1. em anexo, verificou-se que a temperatura de armazenamento aumentou ao longo do ensaio, uma vez que se iniciou a experiência no início da Primavera e as temperaturas foram crescendo.

Quanto maior a temperatura de um líquido, menor a quantidade de gás dissolvido na mesma (Gaddy e Wiebe, 1940). Deste modo, o aumento da pressão interna da garrafa pode estar relacionado com o aumento da temperatura justificando o observado para todos os parâmetros em estudo.

As amostras da garrafa armazenada a 4°C e com bentonite apresentaram uma pressão interna inferior a todas as outras variáveis, inclusive à garrafa padrão, ao longo do tempo. A garrafa a 4°C teve em todos os pontos inferiores às restantes variáveis, que está de acordo com o esperado, já que a pressão interna varia inversamente com a temperatura. (Gaddy e Wiebe, 1940).

Como referido anteriormente, a amostra da garrafa contendo bentonite também obteve um valor de pressão interna inferior à amostra padrão. Como é possível verificar através da observação da

Figura 24, na placa YPD (*Yeast Extract Dextrose*) inoculada com bentonite hidratada, desenvolveram-se diversas colônias, confirmando-se assim a contaminação microbiológica da bentonite. Apesar de ter ocorrido uma contaminação da amostra, a diminuição da pressão interna da garrafa pode ter sido causada por ação da bentonite. Estudos sobre retenção de gases com recurso a argilas mostraram que as esmetites (Yang e Li, 1995), argilas ácidas ativadas (Volzone e Ortiga, 2000) e argilas modificadas fisicamente têm sido utilizadas com adsorventes de CO<sub>2</sub> (Volzone Metz *et al.*, 2003).

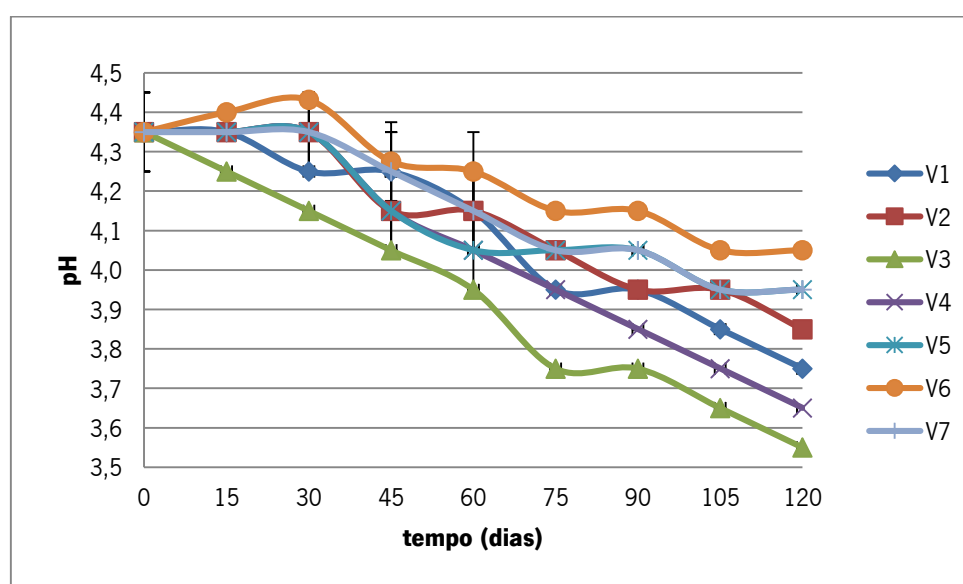
Segundo Volzone (2004) e Yang (1986), a bentonite é um adsorvente com grande afinidade para adsorver compostos líquidos e gasosos. Devido às suas características físico-químicas específicas, ao seu baixo custo e elevada disponibilidade no mercado, a bentonite tem sido utilizada em diversas aplicações, tais como: adsorção de compostos fenólicos (Banat *et al.*, 2000), em metais pesados (Bereket *et al.*, 1997) presentes em resíduos de água e na adsorção de CO<sub>2</sub> (Venaruzzo *et al.*, 2002; Azzouz *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Assim sendo, presume-se que a bentonite adsorveu uma parte do CO<sub>2</sub> presente na cerveja diminuindo a pressão interna da garrafa. Esta diminuição da concentração de CO<sub>2</sub> pode não ser desejável, uma vez que, o CO<sub>2</sub> assume um papel antimicrobiológico, evitando o crescimento de microorganismos indesejáveis na cerveja (Walkling-Ribeiro *et al.*, 2011). Por outro lado, neste caso específico, a diminuição da pressão interna pode ser benéfica, uma vez que as garrafas utilizadas pela empresa têm um valor de pressão interna máximo recomendado de 3,5 bar (valor fornecido pelo fornecedor). Pela observação do gráfico, verifica-se que as variáveis se encontram próximas do valor máximo recomendado pelo fornecedor. As garrafas de cor verde e transparente e a garrafa desinfetada com P3-Asepto (2%) apresentaram uma pressão interna muito semelhante à garrafa padrão no final dos 120 dias, o que indica que estas variáveis não influenciaram a pressão interna das garrafas.

A garrafa com excesso de levedura, apesar de ter uma pressão interna semelhante à garrafa padrão ao longo do tempo, obteve o maior valor de pressão interna, indicando que pode ter ocorrido uma re-fermentação da amostra em garrafa levando a uma maior produção de CO<sub>2</sub> e consequente aumento da pressão interna (Priest e Stewart, 2006). O aumento da pressão interna pode ser considerado um resultado negativo, uma vez que o CO<sub>2</sub> em excesso influencia o sabor presente na cerveja (Gresser, 2009).

Como se pode observar no gráfico da Figura 25, o valor do brix da amostra com excesso de levedura foi um pouco inferior às restantes variáveis ao longo do tempo, o que pode sugerir um consumo de açúcares fermentescíveis residuais pela levedura, produzindo CO<sub>2</sub> adicional.

### 5.3. pH

O pH tem influência na qualidade final da cerveja podendo afetar negativamente a mesma. A cerveja final deve ter valores de pH compreendidos entre 4,3-4,6. Segundo (Baxter e Hughes, 2001), valores de pH abaixo de 4,2 devem ser evitados, pois conferem um sabor ácido à cerveja. Ao analisar o gráfico da Figura 23, verificou-se uma diminuição do pH ao longo do tempo para as sete variáveis em estudo.



**Figura 23-** Representação gráfica da variação do pH para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

À semelhança da variação da pressão interna, a diminuição do pH ao longo do tempo pode estar relacionada com o aumento da temperatura de armazenamento das amostras ao longo do tempo e pelo possível aumento de reações de oxidação (Heuberger *et al.*, 2014). Destacam-se as oxidações de álcoois, degradação oxidativa de ácidos de amargor do lúpulo e de ésteres de acetato, oxidação de terpenos, auto-oxidação de ácidos gordos, oxidação enzimática de lípidos e degradação oxidativa de grupos carbonilo, formação de éter furânico, reações de *Maillard*, síntese de ésteres voláteis, entre outros (Gresser, 2009; Saison *et al.*, 2009). Estas reações levam à formação de compostos de carbonilo, em particular, aldeídos, responsáveis por influenciar



negativamente o aroma da cerveja (Gresser, 2009; Moreira *et al.*, 2013). Também se observou que entre o dia 45 e o dia 60 de experiência, todas as amostras, excepto a amostra da garrafa a 4°C, tinham valores de pH abaixo de 4,2. No final dos 120 dias de experiência, as amostras das garrafas de cor verde, e a amostra da garrafa desinfetada com P3-Asepto (2%) obtiveram valores de pH semelhantes ao da amostra padrão (cor âmbar). Isto significa que estas variáveis não contribuíram para qualquer variação significativa do pH da cerveja.

Observando o gráfico da Figura 23, verificou-se que a amostra a 4°C foi a que obteve um menor decréscimo do pH ao longo do tempo parecendo estabilizar a 4,0. Segundo Heuberger *et al.*, (2012) uma baixa temperatura de armazenamento, neste caso a 4°C, permite a preservação de metabolitos, tais como, ácidos orgânicos e compostos aromáticos (álcoois superiores, ésteres e ácidos gordos, compostos carbonilo, entre outros) que fornecem aromas desejados às cervejas e retarda a possível ocorrência de oxidações (Briggs *et al.*, 2004). Assim, uma menor temperatura de armazenamento da amostra originou uma descida menos acentuada do pH, permitindo uma maior estabilidade da amostra ao longo do tempo.

Por outro lado, as amostras da garrafa com excesso de levedura, da garrafa transparente e da garrafa com bentonite apresentaram o maior decréscimo do pH, como se pode observar pelo gráfico da Figura 23. Na produção de cerveja, a levedura é responsável pela produção de diversos compostos através de processos bioquímicos complexos. Entre estes compostos produzidos, encontram-se os ácidos orgânicos. (Gresser, 2009). Assim, a levedura em excesso vai levar à produção de uma excessiva quantidade de ácidos, com consequente diminuição do pH ao longo do tempo. O decréscimo acentuado do pH na amostra da garrafa transparente vai de encontro ao esperado. Segundo Stewart, (2006), as garrafas de vidro transparentes acarretam desvantagens quanto à proteção contra a luz quando comparadas com garrafas verdes ou âmbar. A cerveja é muito sensível à luz e quando exposta a gamas de radiação UV de 350-400 nm pode levar a uma alteração indesejada no sabor e aroma da cerveja devido à ocorrência de reações químicas e consequente formação do composto 3-metil-2-butenol-1-ol (*MBT*) e pode levar à ocorrência de fenómenos de oxidação da cerveja. Assim sendo, a maior exposição à luz e uma temperatura de armazenamento elevada, levou à aceleração de fenómenos de oxidação da cerveja ao longo do tempo (ex: formação de ácidos orgânicos) com aumento da acidez da amostra e consequente diminuição do pH.

A amostra com bentonite (cola de estabilização) foi a que obteve um maior decréscimo do valor de pH ao longo dos 120 dias. Além disso, ao longo do tempo, verificou-se que a amostra estava

turva. Visto que a bentonite é utilizada para clarificar a cerveja, suspeitou-se que a amostra podia ter sido contaminada pela bentonite. Deste modo, recolheu-se uma amostra de bentonite e realizou-se uma análise laboratorial, com recurso a um espalhamento da amostra numa placa YPD, meio rico mais utilizado para crescimento de fungos e leveduras e, LB (*Lysogeny broth*) para o crescimento de bactérias (Madigan *et al.*, 1997).

Na placa LB não ocorreu o aparecimento de colónias, no entanto, como é possível verificar através da observação da Figura 24, na placa YPD desenvolveram-se diversas colónias, confirmando-se assim a contaminação microbiológica da bentonite.



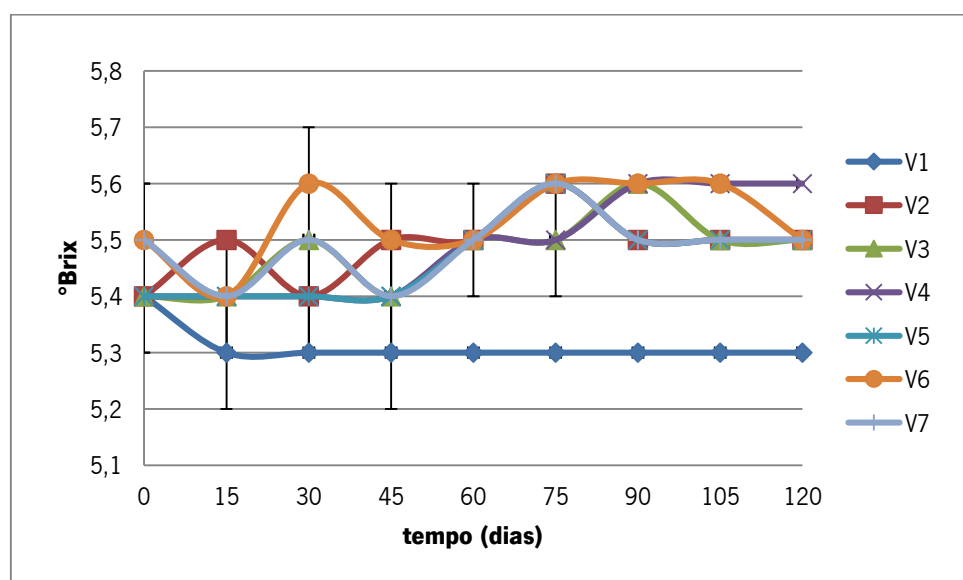
**Figura 24**—Imagem da placa YPD inoculada com bentonite hidratada e a respetiva contaminação microbiológica

Os fungos conseguem prosperar em meios com uma gama de pH entre 2 e 9 e temperatura entre 2 e 40°C (Lewis e Young, 1995). Estes podem produzir proteases que fazem a digestão de proteínas da cerveja e vão afetar a cor, o sabor, a textura, o pH e as características de formação de espuma na cerveja final (Wolf-Hall, 2007; Haikara, 1983). Além disso, os fungos têm a capacidade de produzir diversos tipos de ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico, cítrico, glucónico, itacónico, oxálico, fumárico e málico, através da realização de fermentações ácidas, convertendo açúcares (ex: glucose e sacarose) em ácidos (Magnuson e Lasure, 2004). Assim, a produção de ácidos orgânicos levou a uma diminuição acentuada do pH e a produção de proteases responsáveis pela degradação de proteínas da cerveja originou o aparecimento da turvação.

#### 5.4. Brix

O brix é uma medida do conteúdo de sólidos solúveis em solução aquosa (Kleinhenz, 2012). No caso das cervejas, o composto solúvel maioritário em solução é o açúcar, logo o °Brix vai fornecer o conteúdo de açúcar presente em solução (Mignani, 2013). ). (Mesmo sabendo que o etanol interfere na leitura do Brix, este fator foi negligenciado devido à comparação ter sido realizada nas amostras de cerveja e todas conterem etanol).

Ao analisar o gráfico da Figura 25, constatou-se que ao longo dos 120 dias de experiência não se verificaram variações consideráveis do brix, exceto para a amostra contendo um excesso de levedura.



**Figura 25**-Representação gráfica da variação do brix para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

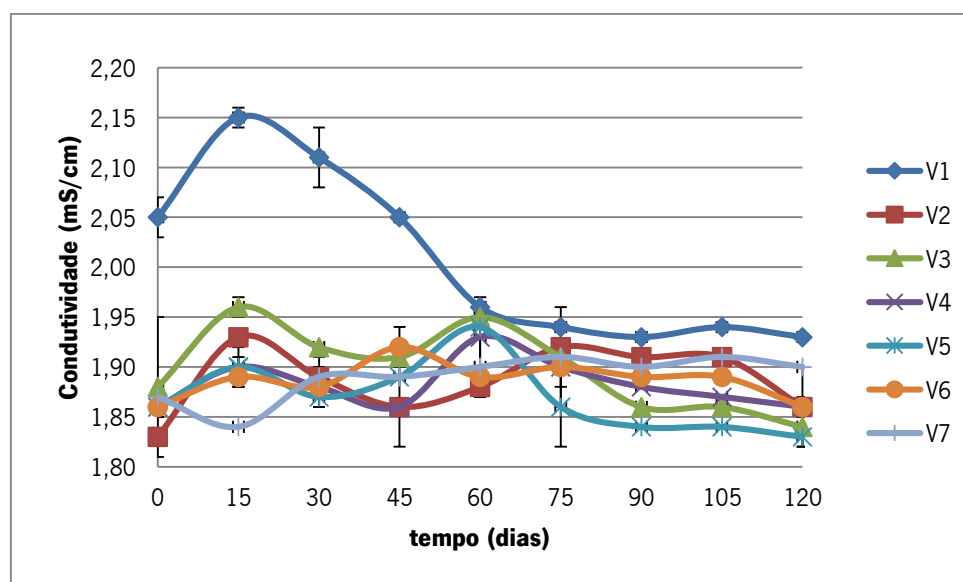
Também se observou que a gama de variação do brix ao longo do tempo, está de acordo com a gama de valores pretendidos para o processo de produção implementado na fábrica.

Para cada variável, verificou-se a ocorrência de oscilações do brix ao longo do tempo as quais deverão estar correlacionados com a variabilidade do método de medição devido à calibração do refratômetro digital.

Observando o gráfico da Figura 25, verificou-se que o valor do brix para a amostra com excesso de levedura foi menor que as outras variáveis ao longo do tempo. De facto, esta diminuição do brix destacou-se logo aos 15 dias de experiência e seguiu essa tendência ao longo dos 120 dias de experiência. Este resultado poderá indicar que foram consumidos açúcares fermentescíveis residuais por parte levedura que se encontravam presentes na amostra, levando a uma consequente redução do brix. Deste modo, a diminuição do brix pode ser coerente com anteriormente discutido e o aumento da pressão interna (Figura 22) para a amostra com excesso de levedura.

### 5.5. Condutividade e % de sal

A condutividade permite a determinação da quantidade de sais totais dissolvidos numa solução aquosa através de uma corrente elétrica que atravessa a amostra e determina o poder de condutividade desse líquido (Queeney, 2003). Assim sendo, quanto mais mineral for a cerveja, maior condutividade apresenta. Nas cervejas, o valor de condutividade está compreendido entre 1,2 e 2,3 mS/cm (www.hyfoma.com; Zhang, 2007).

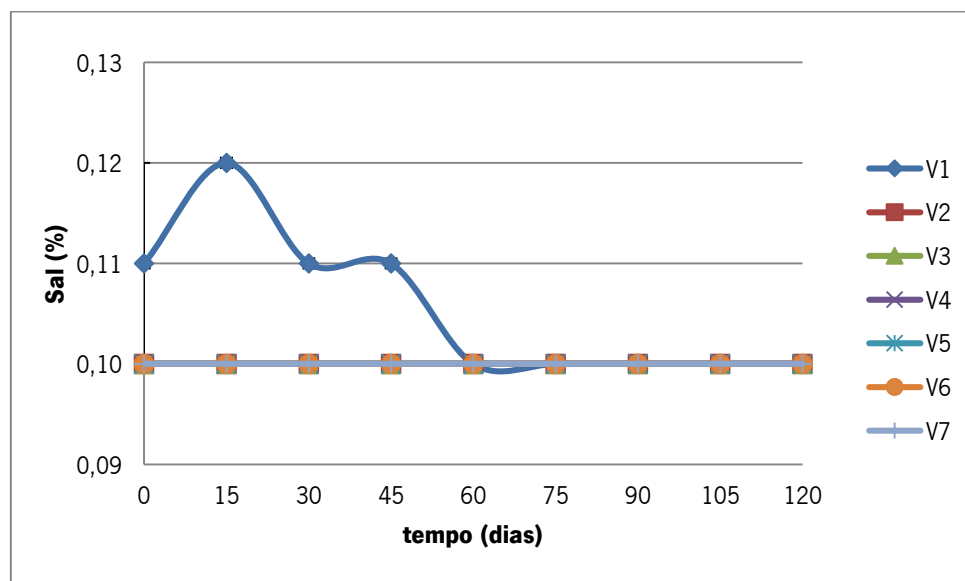


**Figura 26**-Representação gráfica da variação da condutividade para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Através da análise dos gráficos da Figura 26, foi possível observar que a condutividade das diferentes amostras não obteve grande variação ao longo do tempo, excetuando a amostra contendo excesso de levedura. Também se constatou que os valores de condutividade obtidos ao longo do tempo estavam dentro da gama de valores esperado na cerveja, ou seja, entre 1,2 - 2,3 mS/cm.

No gráfico da Figura 27, foi possível observar que a % de sal seguiu a mesma tendência do gráfico Figura 26.



**Figura 27**-Representação gráfica da variação da % de sal para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Assim, a % de sal também não teve grande variação ao longo da experiência, excetuando para a amostra com excesso de levedura. A gama de compostos inorgânicos na cerveja é de 0,5 – 2,0 g/L correspondendo a 0,05 – 0,20% do total da composição da cerveja (Cortacero-Ramírez *et al.*, 2003; Hough *et al.*, 1982). Estes minerais incluem cátions, metais e aniões e contribuem diretamente no sabor e clarificação da cerveja. Deste modo, concluiu-se que os valores de % de sal obtidos ao longo do tempo estavam dentro da gama de valores esperados na cerveja.

Até aos 15 dias de experiência, a amostra contendo excesso de levedura apresentou uma maior % de sal e de condutividade em relação às outras seis variáveis. Após os 15 dias de experiência, verificou-se uma diminuição da % de sal e da condutividade. Aos 45 dias de experiência, verificou-se que a % de sal e a condutividade da amostra estabilizaram obtendo valores semelhantes às outras variáveis em estudo. Este resultado indica que a levedura liofilizada utilizada nesta

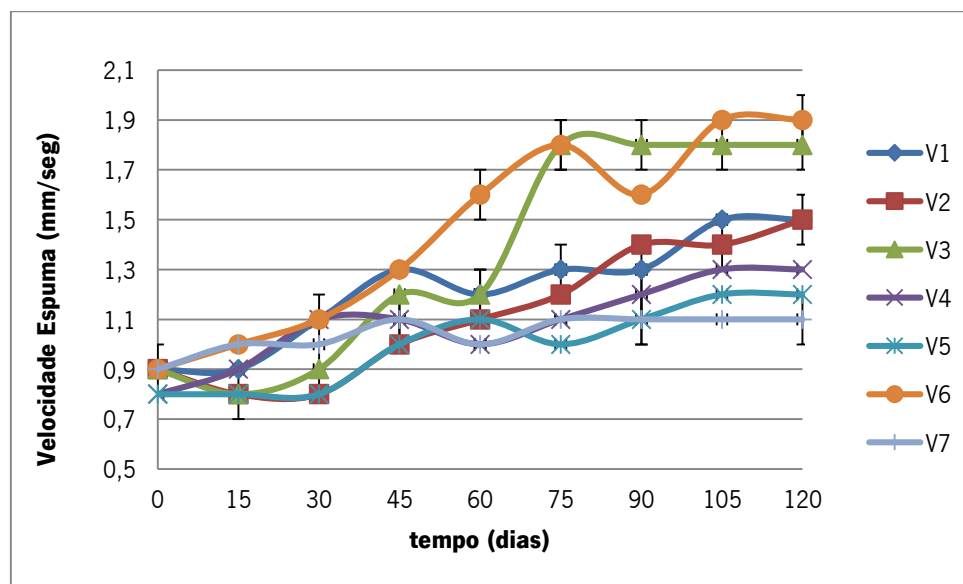
experiência continha uma % de sais na sua constituição, levando a um aumento da condutividade. Segundo Yamada, *et al.*, (2003), a levedura apresenta na sua constituição um elevado teor de proteínas (30 – 70%), sendo rica em vitaminas do complexo B e em minerais.

A partir dos 15 dias de experiência, a levedura consumiu os sais existentes o que levou a um decréscimo da % de sal e consequente diminuição da condutividade. A estabilização da % de sal e da condutividade aos 60 dias de experiência deveu-se ao consumo total dos sais presentes na levedura.

## 5.6. Espuma

A espuma é constituída na sua maioria por polipéptidos com um elevado peso molecular e com propriedades hidrofóbicas que asseguram uma elevada viscosidade e elasticidade da mesma (Gresser, 2009). A presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanos (substâncias não-iónicas hidrofílicas de alto peso molecular), de azoto, oxigénio, meladoínas, glicoproteínas, pentosanos e polifenóis favorecem a estabilidade da espuma (Lusk *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1978).

### 5.6.1. Velocidade de degradação da espuma



**Figura 28**-Representação gráfica da velocidade de degradação da espuma para diferentes variáveis ao longo do tempo

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

O gráfico da Figura 28 demonstra a variação da velocidade de degradação da espuma para várias variáveis ao longo dos 120 dias.

Pela análise do gráfico da Figura 28, verificou-se que a velocidade de degradação da espuma aumentou ao longo do tempo. Mais uma vez, tal como descrito para os parâmetros da pressão interna e do pH, a estabilidade da espuma da cerveja foi afetada pela temperatura de armazenamento e pelo decréscimo do pH que origina reações químicas e fenômenos de oxidação da cerveja com a formação de compostos orgânicos, tais como ácidos orgânicos e alcoóis superiores, compostos carbonílicos, ésteres, entre outros.

A amostra a 4°C e a amostra contendo bentonite obtiveram a maior velocidade de degradação da espuma ao longo dos 120 dias de experiência.

A temperatura de armazenamento tem uma elevada influência nas propriedades da espuma da cerveja, sendo que temperaturas de armazenamento de 2°C levam a uma diminuição da estabilidade da espuma (Gresser, 2009).

Outro fator que pode ter influenciado a estabilidade da amostra armazenada a 4°C foi a quantidade de gás dissolvido na amostra. Quanto menor a temperatura do líquido, maior a quantidade de gás dissolvido na mesma. Desta forma pode-se assumir que quando a cerveja se encontra a 4°C, vai ter uma maior quantidade de gás dissolvido, logo a quantidade de espuma formada é menor (Gaddy e Wiebe, 1940).

Como foi dito anteriormente, também a amostra com bentonite apresentou uma elevada velocidade de degradação da espuma. O aumento da velocidade de degradação da espuma deve-se à excreção de substâncias tais como: glicerídeos e cadeias médias de ácidos gordos produzidos devido a uma possível ocorrência de uma re-fermentação provocada pela contaminação microbiológica. Além disso, a contaminação microbiológica pode ter levado a produção de proteases que têm a capacidade de digerir os compostos proteicos que fazem parte da constituição da espuma, levando a uma degradação da estabilidade da mesma e consequente aumento da velocidade de degradação da espuma (Wolf-Hall, 2007; Haikara, 1983).

Pela observação do gráfico da Figura 28 verificou-se que a velocidade de degradação da espuma das amostras com excesso de levedura, da garrafa transparente e da garrafa desinfetada com Asepto-2000 (2%) foi inferior à das variáveis discutidas anteriormente, no entanto a velocidade de degradação da espuma foi maior em relação à amostra padrão. Segundo Wilde (2003), uma elevada concentração de levedura em cerveja pode levar à redução da estabilidade da espuma. Tal como ocorreu na contaminação microbiológica, também a levedura é responsável pela

excreção de substâncias (ex: glicerídeos e cadeias médias de ácidos gordos) que afetam negativamente a estabilidade da espuma. Assim, pode-se assumir que a levedura em excesso na amostra, afetou negativamente a espuma da amostra, levando à redução da estabilidade da mesma.

Como foi dito anteriormente, a amostra desinfetada com Asepto-2000 (2%) demonstrou uma espuma menos estável obtendo uma maior velocidade de degração da espuma correspondendo a uma menor estabilidade da espuma em relação à amostra padrão.

O contacto de detergentes de limpeza ou/e desinfetantes com a cerveja pode levar a uma diminuição da estabilidade da espuma (Gresser, 2009). Segundo Glas e Scheuing (2000), detergentes com compostos catiónicos e não-iónicos, como é o caso do Asepto-2000, podem reagir negativamente com a espuma, levando a uma diminuição da estabilidade da mesma. Assim, concluiu-se que o uso do desinfetante Asepto-2000 levou a um aumento da velocidade de degração da espuma com consequente diminuição da estabilidade da espuma.

Também a amostra da garrafa transparente obteve uma maior velocidade de degradação da espuma quando comparada com a amostra padrão (cor âmbar). Este resultado obtido vai de encontro ao que foi dito anteriormente. As garrafas de vidro transparentes acarretam desvantagens quanto à proteção contra a luz e podem originar reações químicas e fenómenos de oxidação da cerveja com a formação de compostos orgânicos, tais como ácidos orgânicos, alcoóis superiores e compostos carbonílicos (Stewart, 2006). A presença destes compostos orgânicos afetam negativamente a estabilidade da espuma. Deste modo, a utilização de garrafas transparentes, pode levar a um decréscimo da estabilidade da espuma da cerveja em relação às garrafas de cor âmbar.

A amostra da garrafa verde obteve uma velocidade de degradação da espuma semelhante à velocidade de degradação da garrafa de cor âmbar. Este resultado corrobora o resultado obtido anteriormente para a garrafa transparente, ou seja, a cor da garrafa utilizada tem influência na degradação da espuma da cerveja.

## 5.7. Cor e turvação

De modo a avaliar a cor e turvação foi medida a absorvância das amostras de cada variável de 15 em 15 dias. A gama de comprimento de onda escolhida variou entre 400 e 700 nm. Segundo Johnson *et al.*, (2010), a cor da cerveja é definida aos 430 nm. Assim, através da análise da



Tabela 6 , analisou-se a absorvância obtida em cada tempo para um comprimento de onda de 430 nm.

**Tabela 6**-Valores de absorvância retirados aos 430 nm (comprimento de onda) para as diferentes variáveis ao longo do tempo

| sinal 430 nm | Tempo (dias) |     |     |     |     |      |      |      |
|--------------|--------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
|              | T0           | T1  | T2  | T3  | T4  | T5   | T6   | T7   |
| <b>V1</b>    | 1,1          | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 0,3 | 0,8  | 0,4  | 0,5  |
| <b>V2</b>    | 1,0          | 0,9 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | n.d. | n.d. | n.d. |
| <b>V3</b>    | 1,0          | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,6 | 0,8  | 0,5  | 0,6  |
| <b>V4</b>    | 1,0          | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,4 | 0,7  | 0,7  | 0,6  |
| <b>V5</b>    | 1,0          | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 0,4 | 0,7  | 0,7  | 0,6  |
| <b>V6</b>    | 1,0          | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,8  | 0,5  | 0,5  |
| <b>V7</b>    | 1,0          | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,4 | 0,8  | 0,4  | 0,6  |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão; T0 - 0 dias; T1 - 15 dias; T2 - 30 dias; T3 - 45 dias; T4 - 60 dias; T5 - 75 dias; T6 - 90 dias; T7 - 105 dias; n.d. - não determinado

Através da análise da Tabela 6, foi possível observar uma diminuição considerável dos valores da absorvância para todas as variáveis em T4, seguido de um novo aumento considerável desses mesmos valores em T5 (inferiores aos valores obtidos em T0, T1, T2 e T3). Assim, concluiu-se que em T4 ocorreram anomalias durante a recolha das amostras no espectrofotômetro de fibras óticas, tais como: má calibração do aparelho, sujidade do recipiente onde se coloca a amostra no momento da análise, ou a má cobertura desse mesmo recipiente deixando entrar luz exterior, influenciando o valor final de absorvância.

Através da observação da Tabela 6, considera-se que a alteração da cor foi constante ao longo do tempo de experiência, verificando-se que as amostras das diferentes variáveis ficaram mais límpidas com o decréscimo da absorvância ao longo do tempo. Este fenómeno pode ser explicado com a coagulação e consequente precipitação de compostos proteicos da cerveja, de levedura e de resíduos de lúpulo, entre outros.

Seria de esperar que a clarificação da cor na garrafa com excesso de levedura e na garrafa com bentonite contaminada microbiologicamente e na garrafa transparente ocorrem mais tarde do que nas restantes variáveis, uma vez que, na garrafa com excesso de levedura ocorreu uma re-fermentação o que originou a uma produção excessiva de compostos proteicos levando a um possível aparecimento de turvação e alteração da cor da cerveja.

Como já foi referido anteriormente em 5.3, a possível presença de fungos na garrafa com bentonite podem levar à produção de proteases que fazem a digestão de proteínas da cerveja afetando a cor, o sabor, a textura, entre outras propriedades (Wolf-Hall, 2007; e Haikara, 1983), levando a uma possível alteração da cor e aparecimento da turvação.

A garrafa transparente, por estar mais exposta à luz poderia acelerar a ocorrência de fenómenos de oxidação da cerveja ao longo do tempo e à coagulação de compostos proteicos como referido anteriormente, levando à alteração da cor e ao aparecimento da turvação (Gresser, 2009).

Também seria de esperar que na garrafa a 4°C, a alteração da cor (clarificação) ocorre mais cedo que nas restantes variáveis. Segundo Heuberger *et al.*, (2012), uma baixa temperatura de armazenamento, neste caso a 4°C, permite a preservação de metabolitos, entre eles, compostos proteicos e retarda a possível ocorrência de oxidações e o aparecimento de turvação (Briggs *et al.*, 2004).

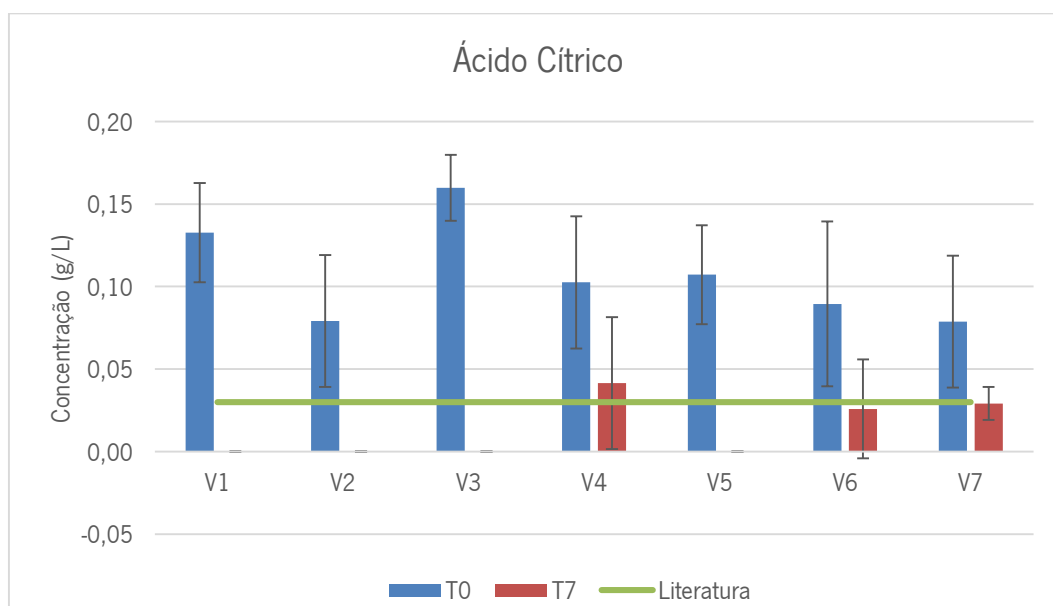
Assim sendo, já que a alteração da cor nas diferentes variáveis foi constante ao longo do tempo, foi possível concluir que a temperatura de armazenamento foi o fator que mais contribuiu para a alteração da cor nas cervejas. As elevadas temperaturas de armazenamento levam à ocorrência de fenómenos de oxidação da cerveja e à coagulação de compostos proteicos, tais como: polifenóis, polipéptidos e polissacárideos (Gresser, 2009).

Não foi possível retirar qualquer conclusão sobre a alteração da cor na garrafa desinfetada com P3-Asepto (2%), uma vez que, faltaram pontos das curvas de absorvância aos 430 nm, devido a erros ocorridos no programa R-Project, não sendo possível verificar uma continuidade nos valores de absorvância obtidos de 15 em 15 dias, para cada variável, ao longo da experiência.

#### 5.8. Quantificação de compostos maioritários – HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Os compostos quantificados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) foram: o etanol, o glicerol, hidratos de carbono (glucose, maltose e frutose) e o ácido acético, succínico, cítrico, málico e láctico.

## 5.8.1. Ácido cítrico



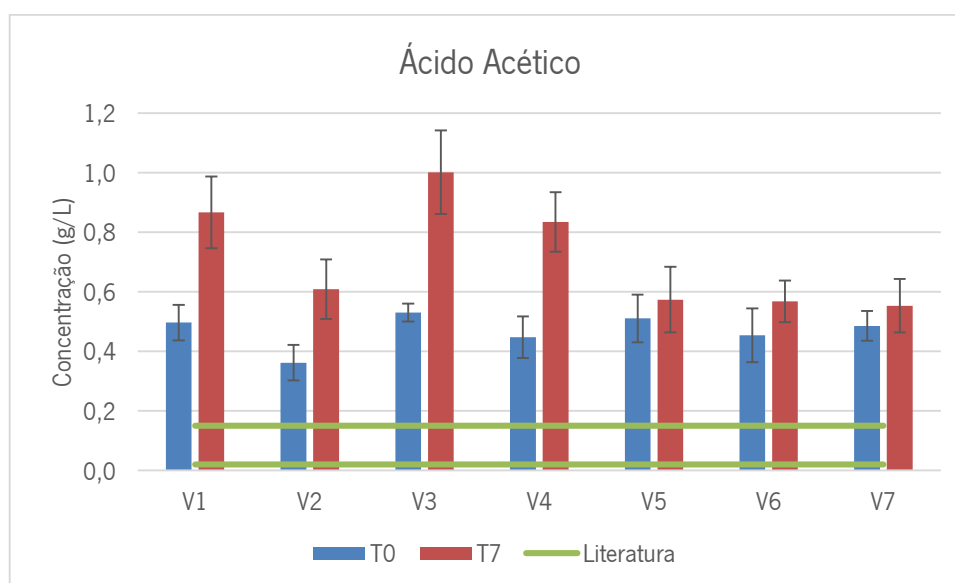
**Figura 29**-Representação gráfica da concentração de ácido cítrico para cada variável no início e no final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de ácido cítrico descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Através da análise do gráfico da Figura 29, observou-se que no início da experiência, o ácido cítrico se encontrava presente em todas as variáveis, sendo encontrado em maior concentração na garrafa com bentonite e na garrafa com excesso de levedura, respectivamente. Sendo este ácido um subproduto da fermentação, este resultado indica a ocorrência de re-fermentações em garrafa derivadas da contaminação da bentonite e do excesso de levedura. A concentração de ácido cítrico na cerveja varia entre 0,03 e 0,3 g/L (Montanari *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2010). Assim, pode-se concluir que as concentrações encontradas no início da experiência estão dentro da gama de valores descritos acima. No final da experiência, não se verificou a presença deste ácido na garrafa com excesso de levedura, garrafa com bentonite, garrafa desinfetada com Asepto (2%) e na garrafa verde, tendo-se verificado a sua presença em pequenas concentrações na garrafa transparente, na garrafa armazenada a 4°C e na garrafa padrão. Estes resultados indicam que este ácido foi degradado através de fenómenos de oxidação que ocorrem ao longo do tempo como descrito em 5.3.

### 5.8.2. Ácido acético

Através da análise do gráfico da Figura 30, verificou-se que ocorreu um aumento da concentração de ácido acético em todas as variáveis, ao longo do tempo, sendo que a garrafa com bentonite, garrafa com excesso de levedura e garrafa transparente, foram as variáveis que obtiveram maiores concentrações deste ácido, respetivamente, no final da experiência.



**Figura 30**-Representação gráfica da concentração de ácido acético para cada variável no início e final da experiência

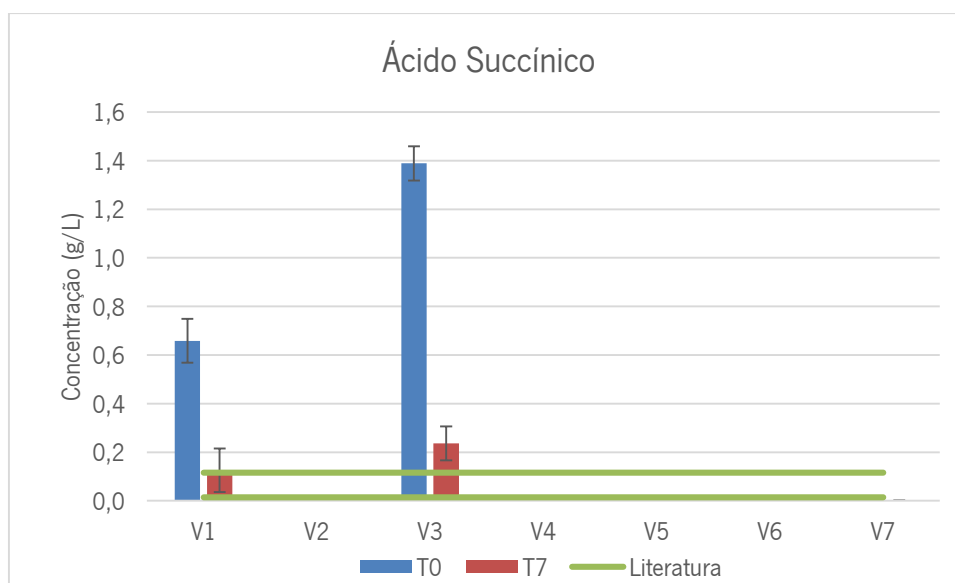
\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de ácido acético descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

O aumento da concentração do ácido acético na garrafa com excesso de levedura e na garrafa com bentonite está relacionado com a ocorrência da re-fermentação em garrafa. O aumento da concentração do ácido acético na garrafa transparente deveu-se à ocorrência de fenómenos de oxidação da cerveja devido à exposição à luz, como foi descrito em 5.3. Também se constatou que este ácido se encontrou presente em concentrações acima do que seria de esperar em todas as variáveis, pois, de acordo com a literatura, a concentração deste ácido na cerveja varia entre 0,020 e 0,150 g/L (Kuck, 2008; Montanari *et al.*, 1999). De notar que neste estudo, a cerveja utilizada é do tipo Lager, não descrevendo qual a cerveja em estudo, podendo levar à obtenção de diferentes gamas de concentração de ácido acético. A elevada concentração deste ácido pode ter ocorrido devido a vários fatores. Pelo facto de na cerveja artesanal não ser realizada a etapa de pasteurização, as leveduras presentes na cerveja podem re-fermentar em garrafa produzindo uma elevada concentração deste ácido. Também devido ao processo de fabrico implementado, ao tipo

de cereal e levedura utilizada, pode originar um aumento da concentração dos ácidos orgânicos, como é o caso do ácido acético.

### 5.8.3. Ácido succínico

Através da análise do gráfico da Figura 31, constatou-se que ao longo da experiência, o ácido succínico apenas se encontrou presente na garrafa com excesso de levedura e na garrafa com bentonite, em concentrações muito superiores ao encontrado na literatura.



**Figura 31**-Representação gráfica da concentração de ácido succínico para cada variável no início e final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de ácido succínico descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

O ácido succínico na cerveja encontra-se numa gama de concentrações entre 0,015-0,116 g/L (Montanari *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2010). Como foi descrito anteriormente para o ácido acético, a concentração de ácido succínico pode ser superior ao encontrado na literatura, uma vez que pelo facto de não se realizar a etapa de pasteurização, as leveduras presentes na cerveja podem re-fermentar em garrafa produzindo uma elevada concentração deste ácido. Assim, também o processo de fabrico implementado, o tipo de cereal e levedura utilizada pode influenciar a concentração final deste ácido.

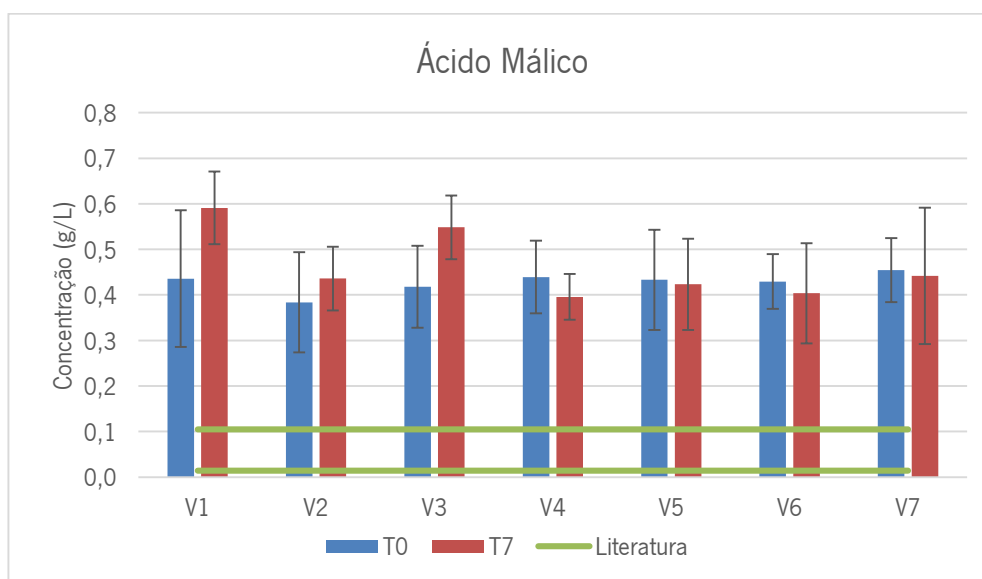
Pelo facto deste ácido não se encontrar presente em mais nenhuma variável, poderá indicar que a levedura utilizada no fabrico desta cerveja não produziu este ácido durante a fermentação. Por

outro lado, a presença de elevadas concentrações deste ácido na amostra da garrafa com levedura em excesso, poderá sugerir que esta levedura adicionada produziu este ácido por re-fermentação em garrafa. Além disso, a presença do ácido succínico na amostra da garrafa contendo bentonite indica que, devido à contaminação microbiológica desta, este ácido poderá ter sido produzido através de uma re-fermentação ácida em garrafa, como já foi descrito em 5.3.

Também se verificou uma diminuição da concentração deste ácido nas duas variáveis, indicando que o ácido succínico foi degradado ao longo do tempo. Esta degradação deveu-se a fenómenos de oxidação que ocorrem nas cervejas ao longo do tempo, como foi descrito em 5.3.

#### 5.8.4. Ácido málico

A concentração de ácido málico na cerveja encontrada na literatura varia entre 0,014-0,105 g/L (Montanari *et al.*, 1999). Através da observação do gráfico da Figura 32, constatou-se que a concentração deste ácido foi muito superior ao referido anteriormente.



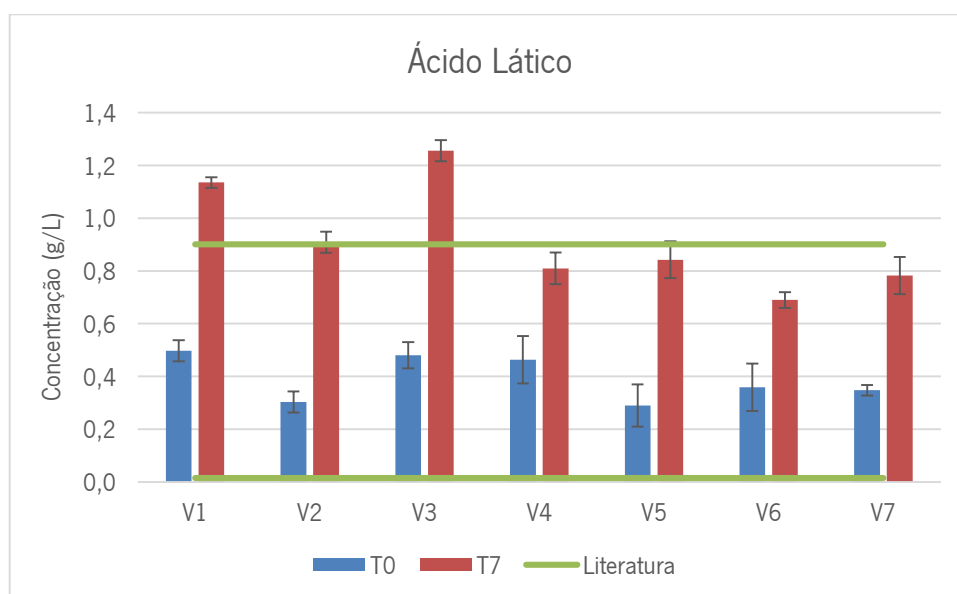
**Figura 32**-Representação gráfica da concentração de ácido málico para cada variável no início e final da experiência  
 \* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de ácido málico descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

De notar que neste estudo, a cerveja utilizada é do tipo *Lager*, não descrevendo qual a cerveja em estudo, podendo levar à obtenção de diferentes gamas de concentração de ácido málico. Como

dito anteriormente, a não realização de pasteurização da cerveja artesanal e o tipo de matéria-prima e levedura utilizada na produção desta cerveja, poderá ter originado uma elevada produção de ácido málico. Analisando o gráfico da Figura 32, verificou-se que, no geral, a concentração do ácido málico variou pouco ao longo da experiência. No entanto, foi possível constatar que se obteve uma maior concentração de ácido málico na garrafa com excesso de levedura e na garrafa contendo bentonite. Do mesmo modo que já foi justificado para outros ácidos, a presença de uma maior concentração de ácido málico nestas duas variáveis em relação às outras, deveu-se à ocorrência de re-fermentação em garrafa.

#### 5.8.5. Ácido Láctico

A concentração de ácido láctico na cerveja varia entre 0,015-0,901 g/L (Klopper *et al.*, 1986). Através da observação do gráfico da Figura 33, constatou-se que a concentração deste ácido ao longo do tempo, se encontrou dentro da gama de concentrações descritas anteriormente, com exceção para a garrafa com excesso de levedura e para a garrafa com bentonite contaminada onde a concentração foi muito superior à gama de concentrações referidas anteriormente.



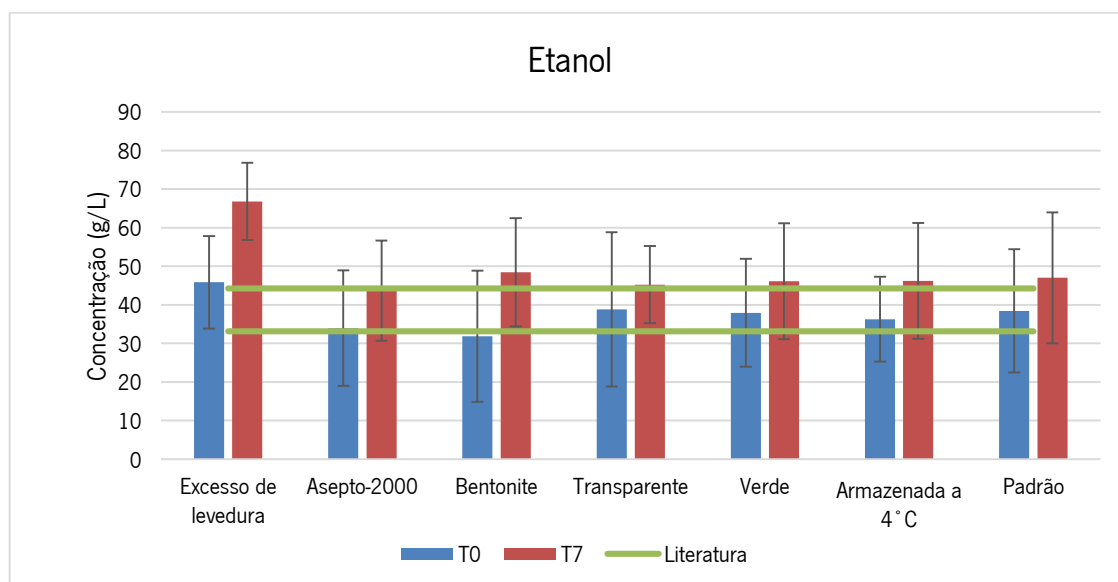
**Figura 33**—Representação gráfica da concentração de ácido láctico para cada variável no início e no final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de ácido láctico descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Este resultado vai de encontro ao que já foi discutido sobre a elevada concentração de diferentes ácidos nestas duas variáveis. A elevada concentração de ácido láctico nas garrafas com excesso de levedura e com bentonite contaminada, deveu-se à ocorrência de re-fermentação em garrafa, causada pelo excesso de levedura e pela contaminação microbiológica da bentonite, respetivamente.

### 5.8.6. Etanol

Através da análise do gráfico da Figura 34, verificou-se que o etanol foi o composto que se apresentou em maior concentração na cerveja. Este resultado vai de encontro ao esperado, uma vez que o etanol e o CO<sub>2</sub> são os principais produtos produzidos pela levedura durante a etapa de fermentação do mosto.



**Figura 34**–Representação gráfica da concentração de etanol para cada variável no início e no final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de etanol descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

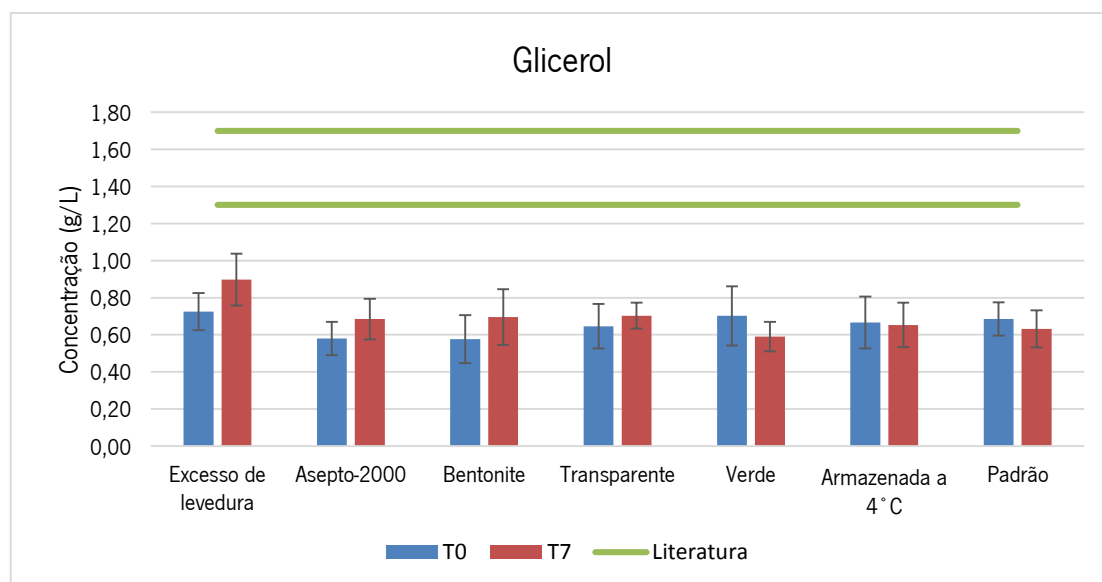
Na cerveja, o etanol está presente numa gama de concentrações de 6,14–98,3 g/L (Castellari *et al.*, 2001), dependendo tipo de cerveja que se pretende obter. A % de álcool na cerveja do tipo *Pilsner* varia entre 4,2 – 5,6 % (Wotring *et al.*, 1998) que corresponde a uma concentração de álcool de 33,1 – 44,2 g/L. Uma vez que a maior parte do álcool presente na cerveja corresponde ao etanol, constatou-se que este se encontra presente dentro/próximo da gama de concentrações



descrita, excetuando na garrafa com excesso de levedura. Também se verificou que, ao longo do tempo, ocorreu uma variação de concentração de etanol. Essa variação poderá indicar que ocorreu re-fermentação em garrafa ao longo do tempo. Devido à concentração de etanol na garrafa com excesso de levedura ser superior às restantes variáveis, tanto no início como no final da experiência e pelo facto da sua concentração ser muito superior à gama de concentrações deste tipo de cervejas, demonstra que ocorreu uma re-fermentação em garrafa, como foi descrito em 5.2. Esta re-fermentação em garrafa não deveria ter originado uma concentração tão alta de etanol, uma vez que a concentração de açúcares consumidos não foi suficiente para originar este aumento, o que pode indicar a ocorrência de erros, associados à calibração do aparelho de HPLC. Apesar da possível ocorrência de erros, os resultados obtidos podem ser considerados, uma vez que estes erros estão associados para todas as variáveis. O facto de não se detetar a presença de glucose e frutose e pelo facto da concentração de maltose diminuir no final da experiência na garrafa com excesso de levedura e na garrafa com bentonite corrobora também a ocorrência de re-fermentações.

#### 5.8.7. Glicerol

Analisando o gráfico da Figura 35, verificou-se que o glicerol apresentou uma concentração muito inferior ao etanol na cerveja.



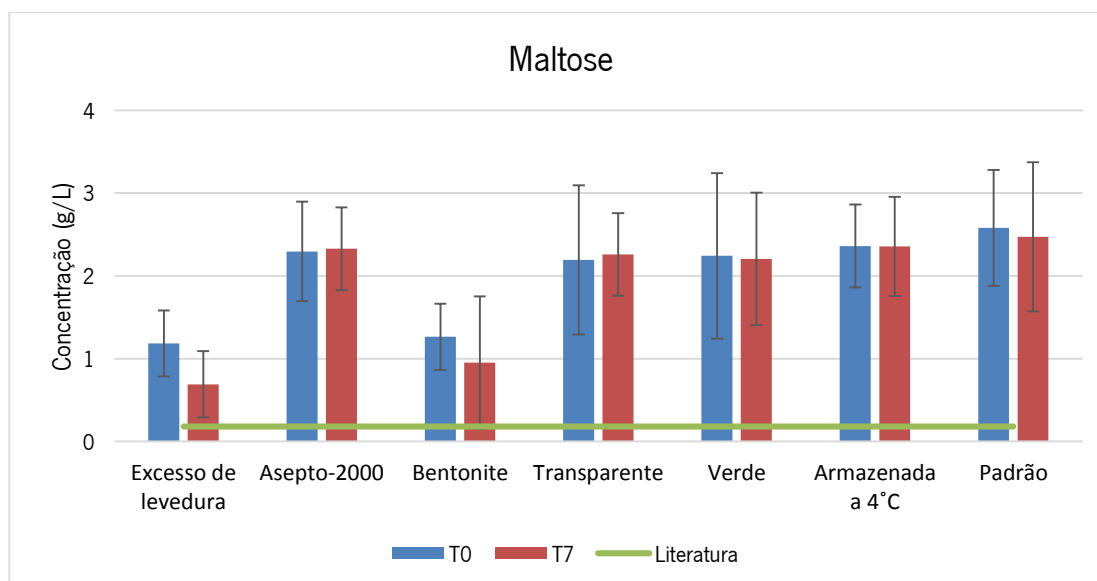
**Figura 35**-Representação gráfica da concentração de glicerol para cada variável no início e no final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de glicerol descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Este resultado vai de encontro ao esperado, uma vez que o glicerol é um produto secundário da fermentação alcoólica e formado durante a glicólise (Esslinger, 2009; Scanes *et al.*, 1998). A sua concentração nas cervejas varia entre 1,3 – 2,0 g/L. Klopper *et al.*, (1986) também descreveu que numa cerveja do tipo *Pilsner*, a concentração de glicerol variava entre 1,3-1,7 g/L. Observando o gráfico da Figura 35, constatou-se que a concentração de glicerol foi inferior às concentrações descritas anteriormente. A concentração deste álcool depende da quantidade de açúcares de fermentação presentes no mosto, da temperatura de fermentação, da concentração de leveduras no mosto e das condições de stress a que a levedura está sujeita durante a etapa de fermentação, entre outros fatores (Esslinger, 2009; Klopper *et al.*, 1986). A síntese de glicerol pela levedura, está relacionada com o equilíbrio redox e com um mecanismo de defesa da levedura (Scanes *et al.*, 1998). Assim, quando a levedura está sujeita a condições de stress hiper-osmótico, esta produz principalmente glicerol, de modo a evitar a difusão de água da levedura para o meio circundante (Scanes *et al.*, 1998). Deste modo, concluiu-se que a menor concentração de glicerol obtida, está relacionada com um ou mais fatores descritos anteriormente.

#### 5.8.8. Maltose

Pela observação do gráfico da Figura 36, verificou-se que a concentração de maltose se encontra na gama de concentrações obtida na literatura. Segundo Castellari *et al.*, (2001), a concentração de maltose na cerveja varia entre 0.18–12.55 g/L.



**Figura 36**-Representação gráfica da concentração de maltose para cada variável no início e no final da experiência

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; Literatura – Gama de concentrações de maltose descrito na literatura; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Também foi possível observar que a concentração de maltose obtida foi muito superior à concentração de glucose e frutose. Este resultado vai de encontro ao esperado uma vez que a maltose corresponde a cerca de 48 – 52 % do total de açúcares no mosto. Além disso, segundo Taylor e Organ (2009), no final da fermentação, apenas a maltose e a maltotriose se encontram presentes na cerveja em maior concentração, sendo a presença de glucose e frutose muito residual, pois as leveduras hidrolisam as hexoses e sacarose (açúcares primários) em primeiro lugar e só depois hidrolisam maltoses e maltotrioses (açúcares secundários) (Munroe, 2006).

Também foi possível observar que a concentração de maltose, no início e no final da experiência, não sofreu alterações consideráveis, excetuando na garrafa com excesso de levedura e na garrafa contendo bentonite. Este resultado indica que o consumo de maltose foi muito residual ao longo da experiência. A diminuição da concentração da maltose na garrafa com excesso de levedura e na garrafa contendo bentonite vai de encontro ao esperado, uma vez que a ocorrência re-fermentação em garrafa (descrita em pontos anteriores) para as duas variáveis, indica que houve consumo de açúcares residuais presentes na cerveja.

### 5.8.9. Glucose e frutose

Na análise realizada por HPLC, não foi detetada a presença de glucose e frutose nas amostras das sete variáveis. Este resultado indica que estes açúcares foram totalmente consumidos pela levedura durante a fermentação alcoólica e vai de encontro ao que foi dito anteriormente sobre o facto da levedura consumir primeiramente os açúcares primários (glucose e frutose) e só depois degradar os açúcares secundários (maltoses e maltotrioses) durante a etapa de fermentação.

### 5.9. Quantificação de compostos minoritários (voláteis) – GC – MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrography*)

A cromatografia de gás (GC-MS) é utilizada com o propósito de separar os compostos voláteis de uma mistura de modo a identificá-los. Nesta análise foram separados: álcoois, ácidos, ésteres, compostos carbonilo e álcoois monoterpénicos.

**Tabela 7**-Variação da concentração dos compostos voláteis para cada variável ao longo do tempo.

| C/(µg/L)             | V1      | V2      | V3      | V4      | V5      | V6      | V7      |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <b>C (T0)</b>        | 27414,0 | 29427,3 | 15207,3 | 34441,0 | 18171,5 | 27718,7 | 33321,4 |
| <b>C (T7)</b>        | 44975,1 | 14543,7 | 36176,1 | 19517,5 | 12614,4 | 12884,5 | 14111,4 |
| <b>% de variação</b> | 64,1    | -50,6   | 137,9   | -43,3   | -30,6   | -53,5   | -57,7   |

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Através da análise da Tabela 7, verificou-se que a concentração final de compostos voláteis diminuiu em todas as variáveis, à exceção das amostras com excesso de levedura e contendo bentonite.

Este resultado indica que ocorreram transformações nas amostras ao longo do tempo de experiência, levando à degradação ou perda de compostos aromáticos, responsáveis pelo aroma e qualidade da cerveja. Segundo Gresser (2009), esta diminuição deve-se à ocorrência de diversas reações químicas, durante o período de armazenamento das amostras. A degradação de

compostos, tais como: álcoois superiores, meladoínas, aminoácidos, ácidos gordos e resinas do lúpulo é causada pela ocorrência de reações de oxidação e redução, sendo o  $O_2$ , o tempo e a temperatura de armazenamento, os principais fatores para a ocorrência destas reações.

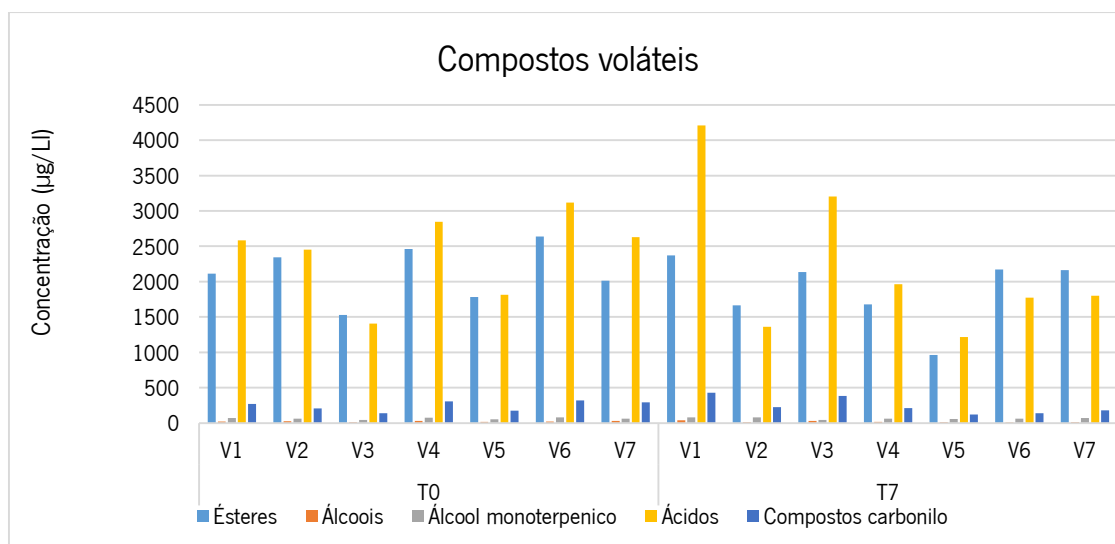
Analisando a Tabela 7, verificou-se que a % de variação da concentração total de compostos voláteis no final da experiência, nas amostras da garrafa desinfetada com Asepto (2%), nas garrafas de cor transparente e verde e na garrafa a 4°C, foi semelhante à da amostra padrão, indicando que a degradação das amostras ao longo do tempo teve um percurso idêntico.

Já para a garrafa com excesso de levedura, verificou-se um aumento da concentração total de compostos voláteis, obtendo-se uma concentração muito superior às amostras referidas anteriormente. Este resultado vai de encontro ao descrito na análise do etanol (Figura 34) indicando a ocorrência de re-fermentação em garrafa.

Apesar da concentração total de compostos voláteis para esta amostra no final da experiência ser semelhante à concentração da amostra padrão no início da atividade, não significa que não ocorreram alterações no perfil aromático da cerveja. Significa sim, que a levedura produziu compostos voláteis em excesso, que podem não ser benéficos para o perfil aromático da cerveja, afetando a sua qualidade.

Através da análise da Tabela 7, observou-se que houve um aumento da concentração dos compostos voláteis na amostra da garrafa contendo bentonite, ao longo do tempo.

Este resultado pode sugerir que a contaminação microbiológica levou à realização de uma re-fermentação em garrafa, com consequente produção de ácidos orgânicos,  $CO_2$  (parcialmente adsorvido pela bentonite) e compostos aromáticos (álcoois superiores, ésteres e ácidos gordos, compostos carbonilo e álcoois monoterpénicos).

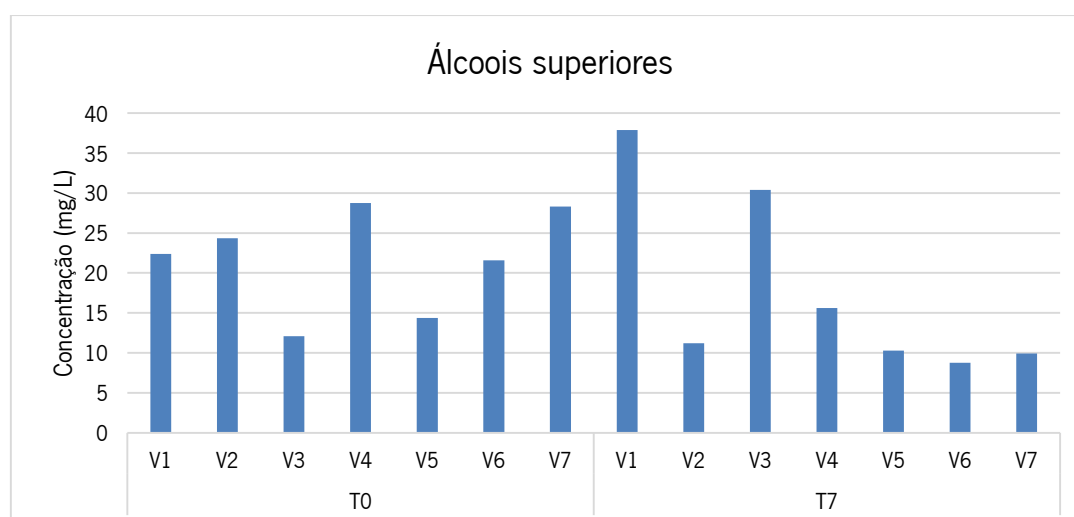


**Figura 37**-Representação gráfica da concentração dos compostos voláteis (ésteres, álcool monoterpénico, ácidos e compostos carbonilo) para cada variável no início (T0) e final da experiência (T7)

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

### 5.9.1. Álcoois superiores

Através da análise do gráfico da Figura 38, observou-se que no final da experiência, os álcoois foram os compostos voláteis encontrados em maior concentração em todas as variáveis. Seguiram-se os ácidos, os ésteres, os compostos carbonilo e por último, o álcool monoterpénico.



**Figura 38**-Representação gráfica da concentração de álcoois superiores para cada variável no início (T0) e no final da experiência (T7)

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

As amostras da garrafa contendo excesso de levedura e bentonite foram as variáveis que apresentaram a maior concentração de álcoois, sendo esta concentração muito superior à da amostra da garrafa padrão. Também se observou que a concentração de álcoois foi maior no final da experiência. O aumento da concentração dos álcoois ao longo do tempo, vai de encontro ao que foi dito em 5.2. e 5.3, indicando a ocorrência de uma re-fermentação da amostra em garrafa. As restantes variáveis apresentaram uma concentração de álcoois inferior, não havendo uma diferença considerável da concentração de álcoois presente nestas amostras em relação à amostra padrão. Também se verificou que a concentração de álcoois para as restantes variáveis diminuiu ao longo do tempo, indicando a ocorrência da degradação destes compostos através de fenómenos de oxidação já descritos anteriormente em 5.3.

**Tabela 8**-Representação dos álcoois detetados na análise de GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 dias de experiência (T7)

|  | <b>C/(mg/L)</b> |           |           |           |           |           |           |
|--|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Álcool</b>                                | <b>V1</b>       | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> |
| <b>2-metil-1-butanol + 3-metil-1-butanol</b> | 20,9            | 1,5       | 15,4      | 8,5       | 5,2       | 0,7       | 0,8       |
| <b>1-octen-3-ol</b>                          | 0,02            | 13,3      | 14,5      | 10,0      | 10,7      | 9,6       | 12,7      |
| <b>2-metil-1-propanol</b>                    | 0,82            | 0,42      | 0,41      | 0,32      | 0,21      | 0,31      | 0,20      |
| <b>1-hexanol</b>                             | 0,04            | 0,03      | 0,03      | 0,02      | 0,02      | 0,02      | 0,02      |
| <b>1-octanol</b>                             | 0,03            | 0,02      | 0,02      | 0,02      | 0,02      | 0,02      | 0,02      |
| <b>álcool furfurílico</b>                    | 0,09            | 0,06      | 0,07      | 0,03      | 0,04      | 0,03      | 0,04      |
| <b>metionol (3-metiltio-1-propanol)</b>      | 0,06            | 0,06      | 0,05      | 0,03      | 0,02      | 0,02      | 0,03      |
| <b>2-feniletanol</b>                         | 15,6            | 8,9       | 14,2      | 6,5       | 4,6       | 7,5       | 8,6       |
| <b>tirosol</b>                               | 0,07            | 0,05      | 0,06      | 0,05      | 0,04      | 0,03      | 0,03      |
| <b>1H-Indole-3-Ethanol</b>                   | 0,21            | 0,18      | 0,16      | 0,12      | 0,07      | 0,08      | 0,08      |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

Conforme se pode observar na Tabela 8, os álcoois 2-metil-1-butanol (álcool amílico), 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 2-feniletanol e 2-metil-1-propanol (isobutanol) apresentaram uma maior concentração em todas as variáveis, no final da experiência.

Segundo Lewis e Young (1995), a concentração destes quatro álcoois numa cerveja do tipo *Lager* é de 10 mg/L, 40 mg/L, 30 mg/L e 10 mg/L, respetivamente. Analisando a Tabela 8, verificou-se que esses álcoois se encontram abaixo das concentrações referidas anteriormente. Três das causas possíveis que contribuem para a formação destes compostos são: o tipo de levedura utilizada, o processo e a temperatura de fermentação (Esslinger, 2009). Assim, a baixa concentração destes álcoois pode ter sido influenciada por um ou mais destes fatores acima descritos.

Como se pode observar pela Tabela 8, no final da experiência, o álcool 3-metil-1-butanol e o 2-metil-1-butanol, o 2-feniletanol e o 2-metil-1-propanol foram detetados em maior concentração na garrafa com excesso de levedura e na garrafa contendo bentonite contaminada. Estes resultados podem ser explicados pela ocorrência de re-fermentação em garrafa para as duas variáveis, com consequente produção destes álcoois superiores.

**Tabela 9**-Concentração do limiar de perceção de álcoois superiores e respetivos aromas

| <b>Álcoois superiores</b> | <b>mg/L</b> | <b>aroma</b>      | <b>Bibliografia</b>          |
|---------------------------|-------------|-------------------|------------------------------|
| <b>2-metil-1-butanol</b>  | 65          | banana; alcoólico | Melkinov, 2007               |
| <b>3-metil-1-butanol</b>  | 45          | banana; alcoólico | Laudaud <i>et al.</i> , 2001 |
| <b>2-metil-1-propanol</b> | 100-200     | álcool; solvente  | Melkinov, 2007               |
| <b>2-feniletanol</b>      | 50          | rosas; perfumado  | Laudaud <i>et al.</i> , 2001 |

Pela observação da Tabela 9 constatou-se que a concentração destes quatro álcoois foi muito inferior ao limiar de perceção de sabor. Este resultado indica que estes álcoois não são sentidos numa prova sensorial.

### 5.9.2. Ésteres

Os ésteres são formados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e são um dos principais compostos voláteis da cerveja, responsáveis pela presença de aromas que aparecem normalmente na cerveja. Quando a sua presença na cerveja é elevada (principalmente em cervejas de caráter



leve como é o caso das *lagers*), pode se assumir que ocorreram problemas no processo de fermentação, podendo tornar-se prejudiciais ao seu caráter (da Silva *et al.*, 2014; Verstrepen *et al.*, 2003).

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 37, no início e final da experiência, obteve-se uma concentração de ésteres muito inferior aos álcoois. Também se verificou que a concentração de ésteres foi semelhante à concentração de ácidos (maioritariamente ácidos gordos) obtidos por GC-MS. Este resultado vai de encontro ao esperado, uma vez que a concentração de ácidos gordos e ésteres na cerveja são semelhantes (Lewis e Young, 1991).

**Tabela 10**-Representação dos ésteres na análise de GS - MS e respectivas concentrações de cada variável no final do dia 105 de experiência (T7).

|                         | C/(µg/L) |       |       |       |       |       |        |
|-------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Ésteres                 | V1       | V2    | V3    | V4    | V5    | V6    | V7     |
| acetato de isobutilo    | 31,3     | 33,5  | 33,1  | 38,3  | 20,5  | 48,8  | 42,9   |
| butirato de etilo       | 63,2     | 251,7 | 48,5  | 54,8  | 44,0  | 47,3  | 46,2   |
| acetato de isoamilo     | 1387,9   | 692,1 | 739,9 | 686,4 | 449,2 | 989,6 | 1008,8 |
| hexanoato de etilo      | 70,3     | 60,8  | 63,9  | 50,9  | 52,5  | 52,8  | 261,5  |
| latato de etilo         | 198,5    | 73,5  | 691,3 | 206,1 | 65,9  | 61,9  | 17,2   |
| octanoato de etilo      | 72,8     | 57,7  | 86,7  | 69,0  | 69,4  | 149,7 | 230,1  |
| decanoato de etilo      | 15,6     | 11,7  | 11,8  | 9,2   | 10,8  | 13,0  | 26,8   |
| succinato de dietilo    | 23,2     | 18,1  | 23,1  | 172,7 | 11,9  | 6,2   | 19,3   |
| acetato de 2-feniletilo | 507,5    | 466,6 | 437,0 | 392,1 | 239,0 | 800,6 | 509,6  |

\* T7- 105 dias de experiência; V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão.

Através da análise da Tabela 10, observou-se que o acetato isoamilo foi o éster obtido em maior concentração para todas as variáveis, no final da experiência. Segundo Verstrepen *et al.*, (2003), este éster é considerado um dos ésteres mais importantes encontrados na cerveja, pois contribui positivamente para o seu aroma, conferindo-lhe um aroma a banana e a pera. A concentração

deste éster numa cerveja do tipo *lager* varia de 300-3800 µg/L (Landaud *et al.*, 2001). Pela observação da Tabela 10 foi possível verificar que a concentração de acetato isoamilo se encontrou dentro da gama indicada anteriormente em todas as variáveis, no entanto constatou-se que foi detetado em maior concentração na garrafa com excesso de levedura. A seguir ao acetato de isoamilo, o éster obtido em maior concentração na análise de GC – MS foi o acetato de 2-feniletilo. Este éster é encontrado nas cervejas numa gama de concentrações idênticas ao seu limite de percepção de sabor (Biazon, 2008). Assim, através da análise da Tabela 10, foi possível verificar que o acetato 2-feniletilo apresentou uma concentração inferior ao descrito na Tabela 11. Segundo Taylor e Organ (2009), a concentração de ésteres presentes na cerveja depende de um largo número de fatores, tais como: o tipo e a condição (viabilidade e vitalidade) da levedura utilizada, a temperatura de maceração do cereal, a temperatura de fermentação, % de oxigénio presente no início da fermentação e a utilização de lúpulo durante a fermentação.

**Tabela 11**-Concentração do limiar de percepção dos ésteres acetato de isoamilo e do acetato de 2-feniletilo e respetivos aromas

| Ésteres                        | µg/L      | aroma            | bibliografia               |
|--------------------------------|-----------|------------------|----------------------------|
| <b>acetato de isoamilo</b>     | 1200-2000 | banana; pera     | Pires <i>et al.</i> , 2014 |
| <b>Acetato de 2-feniletilo</b> | 3000      | rosas, mel, maçã | Melkinov, 2007             |

Através da observação da Tabela 11, verificou-se que o acetato de isoamilo se encontrou presente abaixo do limite de percepção em todas as variáveis, exceto na variável com excesso de levedura, possivelmente, devido a uma re-fermentação em garrafa. Assim sendo, o acetato isoamilo e o acetato de 2-feniletilo não são detetados numa prova sensorial, uma vez que obtiveram uma concentração inferior ao limiar de percepção, não sendo perceptíveis ao ser humano.

### 5.9.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos podem ser encontrados na composição da cerveja e são produzidos pela levedura aquando da realização da fermentação alcoólica. Embora os ácidos gordos sejam encontrados em pequenas concentrações na cerveja, estes afetam a sua qualidade, pois fornecem aromas indesejados à cerveja. Um aumento da sua concentração, em conjunto com um

armazenamento inadequado (ex: temperaturas elevadas) pode levar ao aparecimento de sabores indesejados, quando excedem as concentrações do limiar de percepção de sabor. (Bravi *et al.*, 2014; Clapperton e Brown, 1978).

Segundo Bravi *et al.* (2014), os ácidos gordos interferem negativamente na estabilidade e consequente qualidade da espuma. Esta afirmação vai de encontro ao observado em 5.6.1. onde se verificou que as amostras com excesso de levedura e contendo bentonite obtiveram espumas com baixa estabilidade.

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 37, no final da experiência obteve-se uma concentração de ácidos (maioritariamente ácidos gordos) semelhante à concentração de ésteres, tendo-se verificado uma diminuição da sua concentração no final da experiência em relação ao início, à exceção da garrafa com excesso de levedura e da garrafa com bentonite. Essa diminuição da concentração dos ácidos deveu-se a reações de oxidação descritas em 5.3.

**Tabela 12**-Representação dos ácidos detetados na análise de GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 dias de experiência (T7)

| Ácidos                 | C/(µg/L) |       |        |        |       |        |        |
|------------------------|----------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
|                        | V1       | V2    | V3     | V4     | V5    | V6     | V7     |
| ácido acético          | 168,6    | 101,5 | 154,9  | 225,1  | 68,4  | 55,3   | 62,0   |
| ácido isobutirico      | 31,5     | 53,4  | 41,2   | 29,0   | 18,6  | 14,4   | 0,00   |
| ácido hexanoico        | 694,8    | 475,0 | 666,2  | 444,4  | 296,0 | 259,8  | 235,0  |
| ácido 3-metil-butirico | 123,3    | 184,0 | 132,6  | 86,2   | 61,4  | 49,7   | 59,6   |
| ácido octanoico        | 3191,3   | 548,1 | 2208,5 | 1180,3 | 771,6 | 1395,5 | 1444,7 |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

Através da análise da Tabela 12, pode-se verificar que os ácidos encontrados em maiores concentrações para cada variável, no final da experiência, foram o ácido octanoico e o ácido hexanoico. Estes ácidos fornecem um aroma rançoso à cerveja, sendo por isso considerados *off-flavour*. (Clapperton e Brown, 1978; Engan, 1974).

O ácido octanoico pode ser encontrado nas cervejas, numa concentração que varia entre 2000-8100 µg/L (Engan, 1974). O ácido hexanóico encontra-se presente nas cervejas, em concentrações que variam entre 900-5800 µg/L. Analisando a Tabela 12, constatou-se que no final da experiência, nenhuma das variáveis ultrapassou a concentração máxima referida para estes ácidos. Através da observação da Tabela 12, também se verificou que as amostras com excesso de levedura e com bentonite foram as que obtiveram as maiores concentrações de ácido octanoico e ácido hexanóico que pode ser justificado pela ocorrência de uma re-fermentação em garrafa, como já foi referido anteriormente.

**Tabela 13**-Concentração do limiar de perceção dos ácidos octanóico e hexanóico e respetivo aroma

| <b>Ácidos</b>          | <b>µg/L</b> | <b>aroma</b> | <b>bibliografia</b>              |
|------------------------|-------------|--------------|----------------------------------|
| <b>Ácido octanóico</b> | 5000-14000  | ranço        | Engan, 1974; Lewis e Young, 1995 |
| <b>Ácido hexanóico</b> | 5000        | ranço        | Laudaud <i>et al.</i> , 2001     |

Através da análise da Tabela 13, observou-se que em nenhuma das sete variáveis se atingiu uma concentração superior ao limiar de perceção de sabor destes ácidos gordos descritos anteriormente. O facto de nenhuma das variáveis ter atingido o limiar de perceção de sabor no final da experiência, é um bom indicador da estabilidade da cerveja, já que estes compostos são considerados *off-flavours*, fornecendo um sabor a ranço à cerveja.

#### 5.9.4. Compostos carbonilo

Os compostos carbonilo podem ser produzidos por fermentação alcoólica ou por uma larga gama de reações químicas tais como: oxidação lipídica, reações de *Maillard*, degradações *Strecker*, entre outras. Estas reações acima referidas podem ocorrer durante o armazenamento, resultando na formação de uma vasta gama de compostos carbonilo e consequente deterioração do aroma (Saison *et al.*, 2009). Através da análise do gráfico da Figura 37, observou-se que no final da experiência, os compostos carbonilo apresentaram uma concentração inferior aos álcoois, ésteres e ácidos. Os compostos carbonilo são mais difíceis de detetar em relação aos ésteres e álcoois,

pois encontram-se em concentrações muito mais baixas, têm baixa volatilidade e elevada reatividade para os seus grupos carbonilos polares (Saison *et al.*, 2009).

**Tabela 14**-Representação dos compostos carbonilo e compostos fenólicos detetados na análise GC - MS e respetivas concentrações de cada variável no final de 105 de experiência (T7)

| Compostos Carbonilo<br>e fenólicos      | C/(µg/L) |      |       |      |      |      |      |
|---|----------|------|-------|------|------|------|------|
|   | V1       | V2   | V3    | V4   | V5   | V6   | V7   |
| <b>2(5H)-furanone-<br/>5,5,dimethyl</b> | 98,9     | 52,8 | 59,3  | 51,6 | 25,3 | 33,7 | 39,1 |
| <b>g-nonolactona</b>                    | 58,6     | 64,7 | 68,9  | 61,0 | 23,6 | 34,2 | 38,9 |
| <b>4-vinilguaiaicol</b>                 | 219,4    | 67,8 | 227,2 | 67,9 | 41,0 | 51,7 | 72,8 |
| <b>4-vinilfenol</b>                     | 50,8     | 38,3 | 29,5  | 31,8 | 28,0 | 16,9 | 28,2 |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

Através da observação da Tabela 14 foi possível verificar que no final da experiência, se obteve uma maior concentração de compostos carbonilo na amostra com excesso levedura, indicando a ocorrência de reações químicas durante o tempo de prateleira, que promovem a destabilização das cervejas, influenciando negativamente o aroma da cerveja (Gresser, 2009; Moreira *et al.*, 2013). Igualmente, verificou-se que no final da experiência, o 4-vinilguaiaicol foi o composto carbonilo encontrado em maior concentração nas sete variáveis. Este composto pode ser encontrado em muitas cervejas e é responsável por lhes fornecer aromas a especiarias e a fruta podre (McMurrough *et al.*, 1996). Em algumas cervejas, este composto é muito apreciado, no entanto, na maior parte das cervejas, este é considerado um *off-flavour*. A concentração deste composto na cerveja varia entre 50-550 µg/L. (McMurrough *et al.*, 1996).

Através da análise da Tabela 14, verificou-se que a concentração deste composto encontrou-se dentro da gama de concentração identificada anteriormente para todas as variáveis.

**Tabela 15**-Concentração limiar de percepção do composto fenólico 4-vinilguaiaicol e respetivo aroma

| <b>Compostos<br/>fenólicos</b> | <b>µg/L</b> | <b>aroma</b>             | <b>bibliografia</b>             |
|--------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------------|
| <b>4-vinilguaiaicol</b>        | 200 - 400   | fruta podre, especiarias | McMurrough <i>et al.</i> , 1996 |

Analisando a Tabela 15, observou-se que a concentração limiar de percepção de sabor foi ultrapassada nas amostras da garrafa com excesso de levedura e com bentonite. Segundo McMurrough *et al.*, (1996), três das causas possíveis que contribuem para a formação do 4-vinilguaiaicol são: o tipo de levedura utilizada, o processo de fermentação e a presença de contaminantes na cerveja. Deste modo, a levedura em excesso utilizada nesta experiência pode ter contribuído para a formação deste composto. Também a contaminação da amostra que continha bentonite, levou a um aumento da concentração do 4-vinilguaiaicol.

#### 5.9.5. Álcoois monoterpénicos

O linalool é um dos álcoois monoterpénicos que se encontram presentes na cerveja em muito pequenas concentrações. Este álcool advém do lúpulo e fornece notas aromáticas cítricas, florais e frutadas à cerveja. (Hanke, 2009). Quando o linalool excede os limiar de percepção de sabor, este contribui ativamente para o aroma lúpulado das cervejas (Hanke, 2009).

**Tabela 16**-Representação do álcool monoterpénico linalool detetado na análise GC – MS e respetivas concentrações de cada variável no início (T0) e aos 105 dias de experiência (T7)

|                 | <b>C/(µg/L)</b> |           |           |           |           |           |           |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>linalool</b> | <b>V1</b>       | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> |
| <b>T0</b>       | 69,8            | 62,8      | 48,3      | 76,3      | 53,0      | 81,4      | 61,4      |
| <b>T7</b>       | 70,4            | 57,1      | 58,9      | 60,4      | 56,7      | 60,7      | 69,2      |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

Através da análise da Tabela 16, verificou-se que o linalool foi o composto volátil detetado na cerveja em menores concentrações e que a sua concentração foi semelhante para todas as variáveis durante toda a experiência. Este resultado indicou que o linalool não depende de nenhuma das variáveis adicionadas. Sendo este um composto que advém do lúpulo, não sendo produzido diretamente pela levedura, a ocorrência de re-fermentação em garrafa para esta variável não teve influência na sua concentração, ao contrário do que se observou para os outros compostos voláteis.

**Tabela 17**-Concentração limiar de percepção do álcool monoterpénico linalool e respetivo aroma

| <b>Álcool Monoterpénico</b> | <b>µg/L</b> | <b>aroma</b>                | <b>bibliografia</b>   |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------|---|
| <b>linalool</b>             | 8-80        | frutado, floral,<br>cítrico | Kaltner <i>et al.</i> , 2000 ; Meilgaard, 1975 ;<br>Hanke <i>et al.</i> , 2008; Hanke, 2009 |

Analisando a Tabela 17 foi possível verificar que a concentração limiar de percepção do linalool foi ultrapassada em todas as variáveis no final da experiência. Este resultado obtido pode ser benéfico para a cerveja, pois o linalool fornece-lhes um aroma frutado, floral e citrico às cervejas e aumenta potencialmente a estabilidade da cerveja ao longo do tempo (Hanke, 2009).

## 6. Conclusões e Perspetivas futuras

O objetivo central deste trabalho consistiu em avaliar a influência de um conjunto de variáveis num lote de cerveja do tipo *Pilsner* de modo a entender quais os parâmetros que influenciam a estabilidade da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira.

Este trabalho dividiu-se em três fases diferentes, sendo que numa primeira fase, identificaram-se as variáveis a introduzir e definiram-se quais os parâmetros a monitorizar. Numa segunda fase realizou-se a monitorização do produto ao longo de 120 dias de experiência, quantificando e elaborando um conjunto de perfis de parâmetros físico-químicos. Numa terceira fase procedeu-se à avaliação e determinação das alterações favoráveis a serem introduzidas no processo.

Após a realização deste estudo, concluiu-se que a temperatura de armazenamento tem uma elevada influência na estabilidade da cerveja, uma vez que altas temperaturas de armazenamento aceleram a degradação de metabólitos, tais como: ácidos orgânicos e compostos aromáticos (álcoois superiores, ésteres, ácidos gordos, compostos carbonilo, entre outros) que fornecem aromas desejados e indesejados às cervejas e aceleram a possível ocorrência de oxidações na cerveja e levam à alteração da cor e aparecimento de turvação.

Também se concluiu que a garrafa com excesso de levedura e a garrafa transparente foram as variáveis que tiveram um impacto mais negativo na estabilidade e consequente qualidade da cerveja. No final da experiência, a garrafa com excesso de levedura apresentou o maior valor de pressão interna ( $3,3 \pm 0,0$ ), obteve uma elevada velocidade da degradação da espuma ( $1,5 \pm 0,1$ ) com consequente diminuição da estabilidade da espuma em relação à amostra-padrão. Além disso, a levedura em excesso induziu o aumento da concentração dos compostos maioritários, tais como o ácido acético, o ácido succínico, o ácido cítrico, o ácido málico e o ácido lático e compostos minoritários (ésteres, ácidos gordos, compostos carbonilo, álcoois superiores e monoterpénicos) ao longo do tempo, através do processo de re-fermentação em garrafa, apresentando uma maior concentração destes compostos em relação às restantes variáveis. Entre estes compostos formados, salienta-se o aumento dos compostos carbonilo, que derivam da ocorrência de diversas reações químicas, fornecendo aromas que não são desejáveis para o perfil aromático da cerveja. Na garrafa transparente, verificou-se um aumento da concentração de ácidos ao longo do tempo, com consequente diminuição considerável do pH ( $3,6 \pm 0,0$ ) em relação à amostra-padrão, o que vai de encontro ao esperado, uma vez que as garrafas transparentes acarretam desvantagens



quanto à proteção contra a luz acelerando a ocorrência de fenômenos de oxidação da cerveja. A diminuição acentuada do pH tornou a cerveja mais ácida alterando negativamente as características da cerveja.

Por outro lado, a variável temperatura de armazenamento a 4°C, demonstrou ser a variável que obteve uma maior estabilidade da cerveja, no final dos 120 dias de experiência. Apesar de ter obtido uma maior velocidade de degradação da espuma ( $1,9 \pm 0,1$  mm/seg) e uma pressão interna ( $2,3 \pm 0,1$  bar) inferior à amostra-padrão, este resultado é suplantado por um menor decréscimo do pH ( $4,0 \pm 0,0$ ) em relação a todas as outras variáveis, promovendo um aumento do tempo de estabilidade da cerveja.

As restantes variáveis não demonstraram alterações significativas dos parâmetros em estudo, ao longo da experiência em relação à amostra-padrão.

Pouco se pode concluir da garrafa contendo bentonite, uma vez que esta variável foi contaminada microbiologicamente, influenciando os resultados obtidos nesta experiência. Contudo, pode-se verificar que a bentonite adsorveu CO<sub>2</sub> concluindo, deste modo, que a clarificação de cerveja com a aplicação desta cola pode levar à diminuição da concentração de CO<sub>2</sub> e consequente diminuição da pressão interna. A redução da quantidade de gás na cerveja não é desejável do ponto de vista sensorial e microbiológico.

Após a realização deste trabalho, foi possível identificar algumas possíveis estratégias de otimização a serem implementadas no processo cervejeiro por forma a melhorar a estabilidade sensorial deste tipo de produtos com o tempo. Uma das possíveis estratégias a ser implementada passa pela aquisição de arcaas frigoríficas, de modo a armazenar as garrafas com cerveja para venda. Outra possível estratégia consiste na realização da etapa de pasteurização que vai inativar as leveduras e outros microorganismos indesejáveis presentes na cerveja, preservando assim, o sabor e o aroma da cerveja. Sabendo de antemão que uma das características principais deste tipo de cerveja é o seu aroma lúpulado, sugiro que se adicione uma maior quantidade de lúpulo, já que este tem propriedades antimicrobiológicas e antioxidantes, prevenindo assim, o risco de contaminação por microorganismos indesejados e reduzindo a ocorrência de oxidações na cerveja, prolongando o aroma e o sabor original da cerveja.

Como futuro trabalho a ser desenvolvido na empresa, sugiro a realização de um estudo semelhante ao deste trabalho, onde se pretende avaliar a qualidade da cerveja artesanal ao longo do tempo, em barril, utilizando o mesmo tipo de cerveja (*Pilsner*) e optando por utilizar as mesmas variáveis e parâmetros de avaliação, ou até mesmo adicionando/ substituindo alguma variável/parâmetro,

sempre com o objetivo de implementar possíveis melhorias identificadas ao processo de fabricação no final do estudo.



## Bibliografia

Addy, K., Green, L., Herron, E., (2004). *pH and Alkalinity*, College of the Environment and life Sciences, University of Road Island, United States of America.

Angelino, S.A.G.F., (1991). *Chapter 16: Volatiles in Beer*, In Volatile Compounds in Foods and Beverages (Maarse, H.), *CRC PRESS*, United States of America.

Azzouz, A., *et al.* (2010). *Carbon dioxide retention over montmorillonite–dendrimer materials*. Applied Clay Science 48(1): 133-137.

Bamforth, C., (2003), *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing, Second Edition*, Oxford University Press, Inc.

Banat, F.A., Bashir, B.A., Asheh, S.A., Hayajneh, O. *Adsorption of phenol by bentonite*, Environmental Pollution 107 (2000) 391–398.

Barnes, Z.C., (2006). Chapter 11: *Brewing Process Control*, In Handbook of Brewing (Stewart, G.G. e Priest, F.G.), *CRC PRESS*, Second Edition, United States of America.

Barth-Haas/Group, (2011). *Beer production: Market Leaders and their Challengers in the top 40 Countries in 2011*, Joh. Barth & Sohn GmbH & Co. KG Freiligrathstraße 7/9, Nuremberg, Germany.

Baxter, E.D., Hughes, P.S. (2001). *Beer-Quality, Safety and Nutritional Aspects*, The Royal Society of Chemistry, UK.

Bereket, G., Arog, A.Z., Özel, M.Z. *Removal of Pb(II), Cd(II), Cu(II), and Zn(II) fro-maqueous solutions by adsorption on bentonite*, Journal of Colloid and InterfaceScience 187 (1997) 338–343.

Biazon, C. L. (2008). *Utilização de adsorventes durante o processo de microextração em fase sólida de flavours de cerveja*. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bluml, S. (2009). Chapter 12: *Filling*, In Handbook of Brewing (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Bravi, E., et al. (2014). *Determination of free fatty acids in beer wort*. Food chemistry 151: 374-378.

Briggs, D.E., Boulton, A.C., Brookes, A.P., Stevens, R. (2004). *Brewing: science and practice*, CRC PRESS, England.

Bubacz, M., P. T. McCreanor and H. E. Jenkins (2013). *Engineering of Beer: Hard Work or Too Much Fun?* (2013) ASEE SE Conference Proceedings.

Castellari, M., et al. (2001). *Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV-refractive index double detection*. Journal of chromatographic science 39(6): 235-238.

Carvalho, J.B.M., Felipe, M.G., Matos G., Silva, J.B., Silva, D.P., Teixeira, J.A., Vicente, A.A.; (2009). *Análise da Fermentação em Bioreatores Cilindrocônicos de Bancada na Elaboração de Cerveja com Adjuvante de Banana*, XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, Brasil.

Chen, C., et al. (2013). *Surface modification of a low cost bentonite for post-combustion CO<sub>2</sub> capture*. Applied Surface Science 283: 699-704.

Clapperton, J. and D. Brown (1978). *Caprylic flavour as a feature of beer flavour*. Journal of the Institute of Brewing 84(2): 90-92.

Cortacero-Ramírez, S., et al. (2003). *Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 22(7): 440-455.

Cruz, I., Pinheiro, J.L., Amorim S. M., Kuglin V. B. (2008). *Produção de cerveja. Departamento de engenharia química e engenharia de alimento*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Eaton, B. (2006). Chapter 3: *An Overview of Brewing*, In Handbook of Brewing (Stewart, G. G. e Priest, F. G.), *CRC PRESS*, Second Edition, United States of America.

ECOLAB, *P3-asepto 2000*. Fiche de Données de Sécurité, Règlement CE 1907/2006 et à ses amendements;

Engan, S. (1974). *Organoleptic threshold values of some organic acids in beer*. Journal of the Institute of Brewing 80(2): 162-163.

Esslinger, H.M. and Narziss, L. (2002). *Beer*, in *Ullmann 's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed, Vol. 4, Wiley - VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 657 – 700.

Esslinger, H. M. e Narziss, L. (2005). *Beer*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Federal Republic of Germany.

Esslinger, H.M., (2009). *Chapter 8: Fermentation, Maturation and Storage*, In Handbook of Brewing (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Evangelista, R.R., (2012). *Análise do processo de fabricação industrial de cerveja*, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, Brasil.

Fillaudeau, L. e H. Carrère (2002). *Yeast cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes*. Journal of Membrane Science 196(1): 39-57.

Gaddy, V.L., Wiebe, R., (1940). *The Solubility of Carbon Dioxide in Water at Various Temperatures from 12 to 40° and at Pressures to 500 Atmospheres*. J. Am. Chem. Soc., 62 (4), pp 815–817

Gancedo, C. e Serrano, R. (1989). Chapter 6: *Energy-Yielding Metabolism*, In The Yeasts (Rose, H. A. e Harrison, S. J.), Volume 3, *Academic Press*, England.

Geiger, E. (2002). Gärung, in *Praxishandbuch der Brauerei* (ed. K.U. Heyse), Gehr, Hamburg, Chapter 3.3, pp. 1 – 30.

Gerhäuser, C. (2005). *Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents*. *European Journal of Cancer* 41(13): 1941-1954.

Giovenzana, V., Beghi, R., Guidetti, R., *Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy*, *Journal of Food Engineering* 142 (2014) 80–86.

Glas, K. e Scheuing, R. (2000). *Tenside und Bierschaum*. *Brauwelt* 140(46/47): 2024-2025.

Goodea, K.R., Asteriadou, K., Fryer, P.J., Picksley, M., Robbins, P.T., *Characterising the cleaning mechanisms of yeast and the implications for Cleaning In Place (CIP)*, *Food and Bioprocess Processing* 88 (2010) 365–374.

Gresser, A. (2009). Chapter 15: *Properties and quality*, In *Handbook of Brewing* (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Gresser, A. (2009). Chapter 16: *Stability of Beer*, In *Handbook of Brewing* (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Haikara, A. (1983). *Malt and beer from barley artificially contaminated with Fusarium in the field*, *Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.* 19, 401–408.

Hardwick, A. W. (1995). *Handbook of Brewing*, Marcel Dekker, Inc., New York, United States of America.

Heuberger A.L., Broeckling, C.D. Lewis, M.R., Salazar, L., Bouckaert, P., Prenni, J.E. *Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage*; Journal Food Chemistry 135 (2012) 1284–1289.

Hibbett, D.S., Binder. M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., *et al.* (2007). *A higher level phylogenetic classification of the Fungi*, *Mycological Research* 111 (5): 509–547.

Hosterman, J.W., Patterson, S.H. (1992). *Bentonite and Fuller's earth resources of the United States*, U.S. Geological Survey Professional Paper 152, Washington D.C., USA.

Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens. R., Young. T.W., *Malting and Brewing Science*, Volume 2, 2<sup>nd</sup> Edition, Gaithersburg, Maryland, 1982.

Hough, J. S., *et al.* (1982). *Malting and brewing science: hopped wort and beer*, Springer.

Igyor, M. A., Ogbonna, A. C., Palmer, G. H. (2001). *Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour*. *Process Biochemistry*, 36, 1039-1044.

Johnson, J. E., Claverie, M., Wooton, D., (2010). *The Color and Turbidity of Beer*, MicroOptix Technologies, LLC.

Kammhuber. K., Lutz, A., Kneidl. J., Seigner. E., *Mandarina Bavaria* (2013), Institute for Crop Science and Plant Breeding, Bav. State Research Center for Agriculture.

Kendall, N. T. (1995). Chapter 6: *Barley and Malt*, *In Handbook of Brewing* (Hardwick, A. W.), *Marcel Decker, Inc.*, New York.

King, J.P., (1997). Chapter 16: *Instrumentation and Control System*, *In Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (Vogel, H.C.), Second Edition, Noyes Publications, United States of America.

Kleban. J., Nickerson. I. (2011). *The U.S. Craft Brew Industry*, Vol: 18, pag: 33-38, Allied Academies International Conference, Florida, USA.



Kleinhenz, M.D.; Bumgarner, N.R. *Using Brix as an indicator of vegetable Quality*, Department of Horticulture and Crop Science, Ohio State University, 2012.

Klopper, W., *et al.* (1986). *Organic acids and glycerol in beer*. Journal of the Institute of Brewing 92(3): 225-228.

Kruger, E., Anger, H. (1990). *Hefe*, In Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft, Behr's Verlag, Hamburg.

Kuck, L. (2008), *Cerveja: Sabor e Aroma*. Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Kunze, W., (1996). *Tecnology Brewing and Malting: International Edition*, Berlin: VLB.

Landaud, S., *et al.* (2001). *Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation*. Journal of the Institute of Brewing 107(2): 107-117.

Lewis, M.J., Young, T.W., (1995). *Brewing*, Chapman & Hall, London, UK.

Lide, D. R. ed. (1998). *Handbook of Chemistry and Physics* (87 ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 3-374, 5-42, 6-188, 8-102, 15-22.

Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., Penttilä, M. (1998). *Recent advances in the malting and brewing industry*, *Journal of Biotechnology*, 65, 85-98.

Lusk, L.T., Goldstein, H., Ryder, D. (1995). *Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation*. Journal of American Society of Brewing Chemists, 53, 93 - 103.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. Brock., (1997). *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall international, New Jersey.

Magnuson, J. K. e Lasure, L. L. (2004). *Organic acid production by filamentous fungi*. Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine, Springer: 307-340.

Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Syryn, E., Goiris, K., De Coornan, L., *et al.* (2008). *Flavour instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to sensory ageing*. Journal of the Institute of Brewing, 114(2), 180–192.

Matos, R., *Cerveja: Panorama do mercado, produção artesanal e avaliação de aceitação e preferência*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

McMurrough, I., *et al.* (1996). *Control of ferulic acid and 4-vinilguiacol in Brewing*; Journal of the Institute of Brewing 102(5): 327-332.

Mertens, R., (2009). *Chapter 14: Beer Dispensing, In Handbook of Brewing* (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Mignani, A.G., Ciaccheri, L., Mencagli, A.A., Ottevaer, H., Baca, E., Thienpont, H. *Optical measurements and pattern-recognition techniques for identifying the characteristics of beer and distinguishing Belgian beers*, Sensors and Actuators B 179 (2013) 140– 149.

Montanari, L., *et al.* (1999). *Organic and phenolic acids in beer*. LWT-Food Science and Technology 32(8): 535-539.

Moreira, N., *et al.* (2013). *Optimization of the HS-SPME–GC–IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers*. Talanta 117: 523-531.

Munroe, J. H. (1995), Chapter 13: *Fermentation*, In Handbook of Brewing (Hardwick, A. W.), Marcel Decker, Inc., New York, United States of America.

Munroe, J. H. (2006). Chapter 13: *Aging and Finishing*, In Handbook of Brewing (Stewart, G. G. e Priest, F. G.), CRC PRESS, Second Edition, United States of America.

Navarre, C. e Langlade, F (2002). L'oenologie, Tec & Doc.

Nelson, Max. (2005). *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*, Routledge, New York, USA.

Odom, I.E. (1984). *Smectite clay minerals: properties and uses*. Philosophical Transactions Royal Society, London, A., 311, 391-409.

Orth, R., (1998). *The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production*, International Biodeterioration and Biodegradation 41, 201-208.

Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). *Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast*. Applied microbiology and biotechnology, 98(5), 1937-1949.

Praeckel, U., (2009). *Chapter 25: Cleaning and Disinfecting*, In *Handbook of Brewing* (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Ryder, D. S. e Power, J. (2006). Chapter 9: *Miscellaneous Ingredients in Aid of the Process*, In *Handbook of Brewing* (Stewart, G. G. e Priest, F. G.), *CRC PRESS*, Second Edition, United States of America.

R.G.M. van der Sman, H.M. Vollebregt, A. Mepschen, T.R. Noordman, *Review of hypotheses for fouling during beer clarification using membranes*, Journal of Membrane Science 396 (2012) 22-31.

Rehberger, A. J. e Luther, G. E. (1995). Chapter 12: *Brewing*, In *Handbook of Brewing* (Hardwick, A. W.), *Marcel Decker, Inc.*, New York, United States of America.

Roberts, R., Keeney, P.J. and Wainwright, T., (1978). *The effects of lipids and related materials on beer foam*. Journal of the Institute of Brewing, 84 , 9 – 12.

Rodrigues, J., *et al.* (2010). *Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods*. *Analytica chimica acta* 674(2): 166-175.

Saison, D., *et al.* (2009). *Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*. *J Chromatogr A* 1216(26): 5061-5068.

Scanes, K., *et al.* (1998). *Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review*. *South African Journal for Enology and Viticulture* 19: 17-24.

Siebert, K.J. (2006). *Haze formation in beverages*, Food Science and Technology Department, Cornell University, Geneva, NY, USA.

da Silva, G. C., *et al.* (2014). *Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis*. *Food chemistry* 167: 71-77.

Slaughter, J. (2003). *Biochemistry and physiology of yeast growth*, in *Brewing Microbiology* (eds F. Priest and I. Campell), Kluwer, New York , pp. 20–66.

Spencer, T. Dorothy, J. F. Spencer, M. (1990). *Yeast Technology*, Springer-Verlag, Berlim, Germany.

Stevens, J. F. e Page, J. E. (2004). *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!*, *Phytochemistry* 65(10): 1317-1330.

Stewart, G.G. (2006). Chapter 19: *Beer Stability*, In *Handbook of Brewing* (Stewart, G. G. e Priest, F. G.), *CRC PRESS*, Second Edition, United States of America.

Taylor, D. G. (2006). Chapter 4: *Water*, In *Handbook of Brewing* (Stewart, G. G. e Priest, F. G.), *CRC PRESS*, Second Edition, United States of America.

Taylor, B., Organ, G., (2009). Chapter 29: *Sensory Evolution*, In Handbook of Brewing (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Tenge, C. (2009). Chapter 5: *Fermentation, Yeast*, In Handbook of Brewing (Esslinger, H.M.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Vassoler, L. (2009). *Recuperação de dióxido de carbono na indústria cervejeira*, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Brasil.

Venaruzzo, J., *et al.* (2002). *Modified bentonitic clay minerals as adsorbents of CO, CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> gases*. Microporous and Mesoporous Materials 56(1): 73-80.

Verstrepen, K. J., *et al.* (2003). *Flavor-active esters: adding fruitiness to beer*. Journal of Bioscience and Bioengineering 96(2): 110-118.

Walkling-Ribeiro, M., *et al.* (2011). *Processing temperature, alcohol and carbonation levels and their impact on pulsed electric fields (PEF) mitigation of selected characteristic microorganisms in beer*. Food Research International 44(8): 2524-2533.

Wilde, P. (2003). *The physical mechanisms responsible for the destabilization of the beer foam by fatty acids*, in Proceedings of the European Brewery Convention Congress, pp. 875 – 82.

Wolf-Hall, C. E. (2007). *Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing*, International Journal of Food Microbiology, vol 119, pag 89–94.

Wotring, D. S., *et al.* (1998). *Guia de estudo para os exames de cerveja do BJCP*.

Yamada, E. A., *et al.* (2003). *Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados*. Rev. nutr 16(4): 423-432.

Zhang, H. (2007). *Electrical properties of foods*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Developed under the Auspices of the UNESCO: 115-125.

[URL]-<https://microbrewery.wordpress.com/tag/beer-types-2/>, site consultado a 10 de Agosto de 2014.

[URL]- <http://www.cervejaleta.pt/>, site consultado a 21 de Julho de 2014.

[URL]-<http://www.brewersassociation.org/statistics/national-beer-sales-production-data/>, site consultado a 31 de Agosto de 2014.

[URL]-[http://www.hyfoma.com/en/content/food-branches-processing manufacturing/ beverage/ beer/](http://www.hyfoma.com/en/content/food-branches-processing%20manufacturing%20beverage%20beer/), site consultado a 4 de Setembro de 2014.



# Anexos



## A. Anexos

**A.1.** Representação da avaliação da reprodutibilidade do método avaliando os diferentes parâmetros em cinco amostras independentes (n=5) da cerveja Standard.

**Tabela A. 1.** Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 1 através da medição da média e desvio-padrão

|                           | Teste                | Pressão Interna | Brix | pH  | Condutividade | Sal  |
|---------------------------|----------------------|-----------------|------|-----|---------------|------|
|                           |                      | bar             | °    | -   | mS/cm         | %    |
| <b>Cerveja Standard 1</b> | <b>1</b>             | 1,6             | 5,0  | 4,0 | 1,76          | 0,09 |
|                           | <b>2</b>             | 1,7             | 5,1  | 4,0 | 1,73          | 0,09 |
|                           | <b>3</b>             | 1,7             | 5,1  | 4,0 | 1,74          | 0,09 |
|                           | <b>Média</b>         | 1,7             | 5,1  | 4,0 | 1,74          | 0,09 |
|                           | <b>Desvio-Padrão</b> | 0,0             | 0,1  | 0,0 | 0,02          | 0,00 |

**Tabela A. 2.** Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 2 através da medição da média e desvio-padrão

|                           | Teste                | Pressão Interna | Brix | pH  | Condutividade | Sal  |
|---------------------------|----------------------|-----------------|------|-----|---------------|------|
|                           |                      | bar             | °    | -   | mS/cm         | %    |
| <b>Cerveja Standard 2</b> | <b>1</b>             | 1,6             | 5,1  | 4,0 | 1,79          | 0,09 |
|                           | <b>2</b>             | 1,6             | 5,1  | 4,0 | 1,76          | 0,09 |
|                           | <b>3</b>             | 1,6             | 5,1  | 4,0 | 1,79          | 0,10 |
|                           | <b>Média</b>         | 1,6             | 5,1  | 4,0 | 1,78          | 0,09 |
|                           | <b>Desvio-Padrão</b> | 0,0             | 0,0  | 0,0 | 0,02          | 0,01 |

**Tabela A. 3.** Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 3 através da medição da média e do desvio-padrão

|                           | <b>Teste</b>         | <b>Pressão Interna</b> | <b>Brix</b> | <b>pH</b> | <b>Condutividade</b> | <b>Sal</b> |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-------------|-----------|----------------------|------------|
|                           |                      | <b>bar</b>             | <b>°</b>    | <b>-</b>  | <b>mS/cm</b>         | <b>%</b>   |
| <b>Cerveja Standard 3</b> | <b>1</b>             | 1,8                    | 5,1         | 4,0       | 1,76                 | 0,09       |
|                           | <b>2</b>             | 1,8                    | 5,1         | 4,0       | 1,79                 | 0,09       |
|                           | <b>3</b>             | 1,8                    | 5,1         | 4,0       | 1,79                 | 0,10       |
|                           | <b>Média</b>         | 1,8                    | 5,1         | 4,0       | 1,78                 | 0,09       |
|                           | <b>Desvio-Padrão</b> | 0,0                    | 0,0         | 0,0       | 0,02                 | 0,01       |

**Tabela A. 4.** Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 4 através da medição da média e do desvio-padrão

|                           | <b>Teste</b>         | <b>Pressão Interna</b> | <b>Brix</b> | <b>pH</b> | <b>Condutividade</b> | <b>Sal</b> |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-------------|-----------|----------------------|------------|
|                           |                      | <b>bar</b>             | <b>°</b>    | <b>-</b>  | <b>mS/cm</b>         | <b>%</b>   |
| <b>Cerveja Standard 4</b> | <b>1</b>             | 1,7                    | 5,0         | 4,0       | 1,75                 | 0,09       |
|                           | <b>2</b>             | 1,7                    | 5,0         | 4,0       | 1,71                 | 0,09       |
|                           | <b>3</b>             | 1,7                    | 5,0         | 4,0       | 1,75                 | 0,09       |
|                           | <b>Média</b>         | 1,7                    | 5,0         | 4,0       | 1,74                 | 0,09       |
|                           | <b>Desvio-Padrão</b> | 0,0                    | 0,0         | 0,0       | 0,02                 | 0,00       |

**Tabela A. 5.** Avaliação dos triplicados técnicos de diferentes parâmetros da cerveja Standard 5 através da medição da média e do desvio-padrão

|                           | <b>Teste</b>         | <b>Pressão Interna</b> | <b>Brix</b> | <b>pH</b> | <b>Condutividade</b> | <b>Sal</b> |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-------------|-----------|----------------------|------------|
|                           |                      | <b>bar</b>             | <b>°</b>    | <b>-</b>  | <b>mS/cm</b>         | <b>%</b>   |
| <b>Cerveja Standard 5</b> | <b>1</b>             | 1,6                    | 5,0         | 4,0       | 1,84                 | 0,10       |
|                           | <b>2</b>             | 1,6                    | 5,0         | 4,0       | 1,83                 | 0,10       |
|                           | <b>3</b>             | 1,6                    | 5,1         | 4,0       | 1,81                 | 0,09       |
|                           | <b>Média</b>         | 1,6                    | 5,0         | 4,0       | 1,83                 | 0,10       |
|                           | <b>Desvio-Padrão</b> | 0,0                    | 0,1         | 0,0       | 0,01                 | 0,01       |

**A.2.** Representação em tabela da variação da média e do desvio-padrão das sete variáveis em estudo para diferentes parâmetros seleccionados ao longo do tempo de experiência (120 dias).

**Tabela A. 6.** Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da pressão interna para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes

| Pressão Interna |           |           |           |           |           |           |           |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dia             | V1        | V2        | V3        | V4        | V5        | V6        | V7        |
| 0               | 2,6 ± 0,3 | 1,4 ± 0,7 | 1,6 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 | 1,4 ± 0,4 | 1,3 ± 0,3 | 2,1 ± 0,1 |
| 15              | 2,5 ± 0,1 | 1,6 ± 0,5 | 2,1 ± 0,1 | 2,0 ± 0,2 | 2,2 ± 0,1 | 1,7 ± 0,0 | 1,9 ± 0,4 |
| 30              | 2,6 ± 0,4 | 2,5 ± 0,1 | 2,1 ± 0,4 | 3,0 ± 0,2 | 2,9 ± 0,3 | 1,7 ± 0,0 | 2,5 ± 0,3 |
| 45              | 3,2 ± 0,3 | 2,8 ± 0,3 | 2,3 ± 0,1 | 2,9 ± 0,6 | 3,0 ± 0,5 | 2,2 ± 0,1 | 2,5 ± 0,1 |
| 60              | 3,1 ± 0,2 | 2,6 ± 0,5 | 2,2 ± 0,0 | 3,1 ± 0,1 | 2,8 ± 0,5 | 2,0 ± 0,2 | 2,6 ± 0,4 |
| 75              | 3,1 ± 0,2 | 3,0 ± 0,3 | 2,5 ± 0,2 | 3,0 ± 0,1 | 3,1 ± 0,2 | 2,3 ± 0,1 | 2,7 ± 0,0 |
| 90              | 3,3 ± 0,0 | 3,0 ± 0,1 | 2,4 ± 0,0 | 3,0 ± 0,0 | 3,1 ± 0,0 | 2,4 ± 0,0 | 3,0 ± 0,1 |
| 105             | 3,3 ± 0,0 | 3,0 ± 0,1 | 2,3 ± 0,1 | 3,1 ± 0,0 | 3,1 ± 0,1 | 2,3 ± 0,1 | 3,1 ± 0,1 |
| 120             | 3,3 ± 0,0 | 2,9 ± 0,0 | 2,4 ± 0,0 | 3,1 ± 0,0 | 3,1 ± 0,0 | 2,3 ± 0,1 | 3,1 ± 0,1 |

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

**Tabela A. 7.** Representação dos valores médios e desvio-padrão do pH para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média desvio-padrão de duas amostras biológicas independentes

| pH  |           |           |           |           |           |           |           |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dia | V1        | V2        | V3        | V4        | V5        | V6        | V7        |
| 0   | 4,3 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 4,3 ± 0,0 | 4,4 ± 0,0 |
| 15  | 4,3 ± 0,0 | 4,3 ± 0,0 | 4,2 ± 0,0 | 4,3 ± 0,0 | 4,3 ± 0,0 | 4,4 ± 0,0 | 4,3 ± 0,0 |
| 30  | 4,2 ± 0,0 | 4,3 ± 0,1 | 4,1 ± 0,0 | 4,4 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 4,4 ± 0,0 | 4,3 ± 0,1 |
| 45  | 4,2 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 | 4,0 ± 0,0 | 4,1 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 | 4,2 ± 0,1 | 4,2 ± 0,1 |
| 60  | 4,1 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 | 3,9 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 | 4,0 ± 0,1 | 4,2 ± 0,1 | 4,1 ± 0,1 |
| 75  | 3,9 ± 0,1 | 4,0 ± 0,0 | 3,8 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 | 4,1 ± 0,0 | 4,1 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 |
| 90  | 3,9 ± 0,1 | 3,9 ± 0,0 | 3,7 ± 0,0 | 3,8 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 | 4,1 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 |
| 105 | 3,8 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 | 3,6 ± 0,0 | 3,7 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 |
| 120 | 3,7 ± 0,0 | 3,8 ± 0,0 | 3,6 ± 0,0 | 3,6 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 | 4,0 ± 0,0 | 3,9 ± 0,0 |

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

**Tabela A. 8.** Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão do Brix para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes

| <b>Brix</b> |           |           |           |           |           |           |           |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Dia</b>  | <b>V1</b> | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> |
| <b>0</b>    | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,1 | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,1 | 5,5 ± 0,1 | 5,5 ± 0,1 |
| <b>15</b>   | 5,3 ± 0,1 | 5,5 ± 0,0 | 5,4 ± 0,1 | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 |
| <b>30</b>   | 5,3 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,4 ± 0,1 | 5,4 ± 0,1 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,2 |
| <b>45</b>   | 5,3 ± 0,1 | 5,5 ± 0,1 | 5,4 ± 0,1 | 5,4 ± 0,1 | 5,4 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,4 ± 0,0 |
| <b>60</b>   | 5,3 ± 0,0 | 5,5 ± 0,1 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 |
| <b>75</b>   | 5,3 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,1 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 |
| <b>90</b>   | 5,3 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 |
| <b>105</b>  | 5,3 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 |
| <b>120</b>  | 5,3 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,6 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 | 5,5 ± 0,0 |

\* V1 - Garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - Garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

**Tabela A. 9.** Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da condutividade para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes

| <b>Condutividade</b> |             |             |             |             |             |             |             |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Dia</b>           | <b>V1</b>   | <b>V2</b>   | <b>V3</b>   | <b>V4</b>   | <b>V5</b>   | <b>V6</b>   | <b>V7</b>   |
| <b>0</b>             | 2,05 ± 0,02 | 1,83 ± 0,00 | 1,88 ± 0,07 | 1,86 ± 0,01 | 1,86 ± 0,00 | 1,86 ± 0,01 | 1,87 ± 0,01 |
| <b>15</b>            | 2,15 ± 0,01 | 1,93 ± 0,05 | 1,96 ± 0,01 | 1,90 ± 0,02 | 1,90 ± 0,01 | 1,89 ± 0,01 | 1,84 ± 0,00 |
| <b>30</b>            | 2,11 ± 0,03 | 1,89 ± 0,01 | 1,92 ± 0,00 | 1,88 ± 0,00 | 1,87 ± 0,01 | 1,88 ± 0,02 | 1,89 ± 0,02 |
| <b>45</b>            | 2,05 ± 0,00 | 1,86 ± 0,05 | 1,91 ± 0,01 | 1,86 ± 0,04 | 1,89 ± 0,00 | 1,92 ± 0,02 | 1,89 ± 0,00 |
| <b>60</b>            | 1,96 ± 0,01 | 1,88 ± 0,04 | 1,95 ± 0,01 | 1,93 ± 0,03 | 1,94 ± 0,01 | 1,89 ± 0,01 | 1,90 ± 0,03 |
| <b>75</b>            | 1,94 ± 0,00 | 1,92 ± 0,01 | 1,91 ± 0,05 | 1,90 ± 0,02 | 1,86 ± 0,04 | 1,90 ± 0,00 | 1,91 ± 0,00 |
| <b>90</b>            | 1,93 ± 0,00 | 1,91 ± 0,00 | 1,86 ± 0,00 | 1,88 ± 0,00 | 1,84 ± 0,00 | 1,89 ± 0,00 | 1,90 ± 0,00 |
| <b>105</b>           | 1,94 ± 0,00 | 1,91 ± 0,00 | 1,86 ± 0,00 | 1,87 ± 0,00 | 1,84 ± 0,00 | 1,89 ± 0,00 | 1,91 ± 0,00 |
| <b>120</b>           | 1,93 ± 0,00 | 1,86 ± 0,04 | 1,84 ± 0,02 | 1,86 ± 0,01 | 1,83 ± 0,00 | 1,86 ± 0,04 | 1,90 ± 0,00 |

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

**Tabela A. 10.** Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão da % de sal para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes

| Sal (%) |             |             |             |             |             |             |             |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Dia     | V1          | V2          | V3          | V4          | V5          | V6          | V7          |
| 0       | 0,11 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 15      | 0,12 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 30      | 0,11 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 45      | 0,11 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 60      | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 75      | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 90      | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 105     | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |
| 120     | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 |

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

**Tabela A. 11-**Representação da variação dos valores médios e desvio-padrão correspondentes à velocidade de degradação da espuma para as sete variáveis em estudo ao longo do tempo de experiência. Os valores representam a média +/- desvio padrão de duas amostras biológicas e independentes

| Velocidade degradação da Espuma (mm/seg) |           |           |           |           |           |           |           |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dia                                      | V1        | V2        | V3        | V4        | V5        | V6        | V7        |
| 0  | 0,9 ± 0,0 | 0,9 ± 0,0 | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 | 0,9 ± 0,0 | 0,9 ± 0,0 |
| 15                                       | 0,9 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 | 0,8 ± 0,1 | 0,9 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 | 1,0 ± 0,0 | 1,0 ± 0,0 |
| 30                                       | 1,1 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0 | 0,9 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 | 0,8 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 | 1,0 ± 0,0 |
| 45                                       | 1,3 ± 0,0 | 1,0 ± 0,0 | 1,2 ± 0,0 | 1,1 ± 0,1 | 1,0 ± 0,0 | 1,3 ± 0,0 | 1,1 ± 0,1 |
| 60                                       | 1,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0 | 1,2 ± 0,1 | 1,0 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 | 1,6 ± 0,1 | 1,0 ± 0,0 |
| 75                                       | 1,3 ± 0,1 | 1,2 ± 0,0 | 1,8 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0 | 1,0 ± 0,0 | 1,8 ± 0,1 | 1,1 ± 0,0 |
| 90                                       | 1,3 ± 0,1 | 1,4 ± 0,0 | 1,8 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 | 1,6 ± 0,0 | 1,1 ± 0,1 |
| 105                                      | 1,5 ± 0,0 | 1,4 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 | 1,3 ± 0,0 | 1,2 ± 0,0 | 1,9 ± 0,0 | 1,1 ± 0,0 |
| 120                                      | 1,5 ± 0,1 | 1,5 ± 0,0 | 1,8 ± 0,1 | 1,3 ± 0,0 | 1,2 ± 0,0 | 1,9 ± 0,1 | 1,1 ± 0,1 |

\* V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 - Garrafa verde; V6 - Garrafa armazenada a 4°C; V7 - Garrafa-padrão;

### A.3. Representação da quantificação de compostos maioritários por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

**Tabela A. 12.** Concentração dos compostos maioritários detetados nas sete variáveis por HPLC em T0 e T7

|         |    | C/(g/L) | V/ (ml) | %    | Concentrações (g/L) |         |         |         |             |            |               |             |             |
|---------|----|---------|---------|------|---------------------|---------|---------|---------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|
| Amostra |    | Etanol  |         |      | Glicerol            | Maltose | Glucose | Frutose | Ác. Cítrico | Ác. Málico | Ác. Succínico | Ác. Láctico | Ác. Acético |
| T0      | V1 | 45,82   | 58,07   | 5,81 | 0,73                | 1,18    |         |         | 0,13        | 0,44       | 0,66          | 0,50        | 0,50        |
|         | V2 | 33,93   | 43,00   | 4,30 | 0,58                | 2,30    |         |         | 0,08        | 0,38       |               | 0,30        | 0,36        |
|         | V3 | 31,83   | 40,34   | 4,03 | 0,58                | 1,26    |         |         | 0,16        | 0,42       | 1,39          | 0,48        | 0,53        |
|         | V4 | 38,79   | 49,16   | 4,92 | 0,65                | 2,19    |         |         | 0,10        | 0,44       |               | 0,46        | 0,45        |
|         | V5 | 37,92   | 48,06   | 4,81 | 0,70                | 2,24    |         |         | 0,11        | 0,43       |               | 0,29        | 0,51        |
|         | V6 | 36,25   | 45,94   | 4,59 | 0,67                | 2,36    |         |         | 0,09        | 0,43       |               | 0,36        | 0,45        |
|         | V7 | 38,43   | 48,70   | 4,87 | 0,68                | 2,58    |         |         | 0,08        | 0,45       |               | 0,35        | 0,49        |
| T7      | V1 | 66,77   | 84,63   | 8,46 | 0,90                | 0,69    |         |         |             | 0,59       | 0,13          | 1,14        | 0,87        |
|         | V2 | 43,65   | 55,32   | 5,53 | 0,68                | 2,33    |         |         |             | 0,44       |               | 0,91        | 0,61        |
|         | V3 | 48,43   | 61,38   | 6,14 | 0,70                | 0,95    |         |         |             | 0,55       | 0,24          | 1,26        | 1,00        |
|         | V4 | 45,22   | 65,15   | 6,51 | 0,70                | 2,26    |         |         | 0,04        | 0,40       |               | 0,81        | 0,83        |
|         | V5 | 46,41   | 61,66   | 6,17 | 0,59                | 2,21    |         |         |             | 0,42       |               | 0,84        | 0,57        |
|         | V6 | 46,20   | 62,67   | 6,27 | 0,65                | 2,36    |         |         | 0,03        | 0,40       |               | 0,69        | 0,57        |
|         | V7 | 46,98   | 59,54   | 5,95 | 0,63                | 2,47    |         |         | 0,03        | 0,44       |               | 0,78        | 0,55        |

\* T0 – 0 dias; T7 – 105 dias; V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada 4°C; V7 – Garrafa-padrão;

**A.4.** Representação da quantificação dos compostos maioritários detetados por GC – MS (Gas Chromatography – Mass Spectrography) em T0 e T7.

**Tabela A. 13.** Concentração dos compostos minoritários detetados nas sete variáveis por GC - MS em T0 e T7

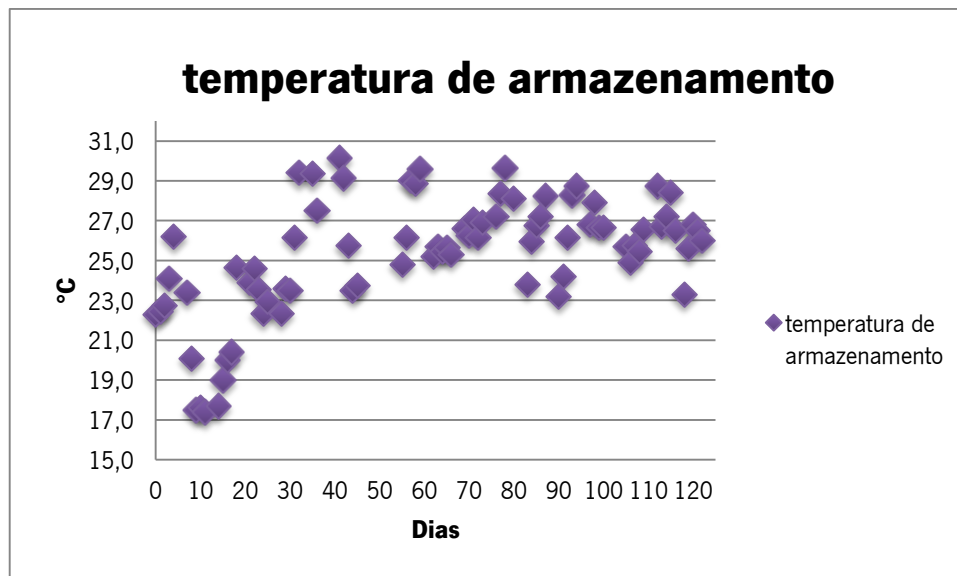
|                | C/(µg/L) |         |        |         |        |         |         |         |        |         |        |        |        |        |
|----------------|----------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
|                | T0 V1    | T0 V2   | T0 V3  | T0 V4   | T0 V5  | T0 V6   | T0 V7   | T7 V1   | T7 V2  | T7 V3   | T7 V4  | T7 V5  | T7 V6  | T7 V7  |
| <b>ésteres</b> | 39,5     | 39,3    | 29,8   | 56,3    | 39,5   | 59,2    | 41,5    | 31,3    | 33,5   | 33,1    | 38,3   | 20,5   | 48,8   | 42,9   |
|                | 61,8     | 62,3    | 39,2   | 63,4    | 48,1   | 55,9    | 56,2    | 63,2    | 251,7  | 48,5    | 54,8   | 44,0   | 47,3   | 46,2   |
|                | 932,1    | 1069,5  | 724,8  | 1059,1  | 802,9  | 1172,7  | 842,9   | 1387,9  | 692,1  | 739,9   | 686,4  | 449,2  | 989,6  | 1008,8 |
|                | 291,0    | 310,9   | 188,0  | 299,4   | 188,6  | 332,3   | 262,4   | 70,3    | 60,8   | 63,9    | 50,9   | 52,5   | 52,8   | 261,5  |
|                | 26,2     | 27,7    | 14,3   | 33,7    | 17,3   | 48,8    | 53,9    | 198,5   | 73,5   | 691,3   | 206,1  | 65,9   | 61,9   | 17,2   |
|                | 178,0    | 193,6   | 123,3  | 236,1   | 159,2  | 223,8   | 182,9   | 72,8    | 57,7   | 86,7    | 69,0   | 69,4   | 149,7  | 230,1  |
|                | 14,9     | 14,5    |        | 8,3     | 10,1   |         | 11,8    | 15,6    | 11,7   | 11,8    | 9,2    | 10,8   | 13,0   | 26,8   |
|                | 13,6     | 13,5    | 7,9    | 12,6    | 9,3    | 15,6    | 11,8    | 23,2    | 18,1   | 23,1    | 172,7  | 11,8   | 6,1    | 19,3   |
|                | 554,2    | 613,3   | 402,1  | 691,6   | 508,5  | 730,6   | 547,8   | 507,5   | 466,6  | 437,0   | 392,1  | 239,0  | 800,8  | 509,6  |
| <b>álcoois</b> | 10872,2  | 12084,3 | 5719,9 | 13704,0 | 6556,0 | 9636,0  | 12848,0 | 20931,8 | 1508,4 | 15406,2 | 8461,6 | 5202,5 | 699,7  | 840,6  |
|                | 13,0     | 12,7    | 7,2    | 16,1    | 8,9    | 13,7    | 13,8    | 18,9    | 13,3   | 14,5    | 10,0   | 10,7   | 9,6    | 12,7   |
|                | 272,3    | 291,0   | 157,8  | 385,8   | 169,0  | 440,5   | 569,5   | 822,1   | 421,6  | 414,9   | 318,4  | 211,3  | 312,1  | 200,0  |
|                | 21,3     | 23,1    | 11,4   | 24,8    | 15,1   | 29,7    | 24,0    | 42,4    | 34,1   | 31,2    | 24,3   | 17,5   | 16,9   | 17,0   |
|                | 22,2     | 20,5    | 13,5   | 23,3    | 16,6   | 27,8    | 20,3    | 32,9    | 22,7   | 20,3    | 18,3   | 17,7   | 16,3   | 20,7   |
|                | 45,8     | 40,8    | 22,3   | 57,4    | 29,2   | 83,6    | 81,9    | 86,4    | 60,2   | 73,2    | 32,7   | 37,4   | 30,0   | 36,0   |
|                | 35,4     | 33,7    | 17,8   | 45,7    | 21,2   | 61,6    | 60,4    | 57,2    | 56,7   | 52,4    | 34,2   | 22,9   | 21,4   | 26,1   |
|                | 10915,3  | 11676,3 | 6039,9 | 14266,5 | 7400,0 | 11028,5 | 14428,4 | 15613,0 | 8867,3 | 14182,7 | 6537,3 | 4632,7 | 7530,1 | 8638,7 |
|                | 65,6     | 38,3    | 28,3   | 61,9    | 36,0   | 73,3    | 82,5    | 69,8    | 54,6   | 56,8    | 47,3   | 37,7   | 28,5   | 30,5   |
|                | 118,0    | 141,3   | 72,3   | 167,7   | 94,2   | 168,9   | 196,8   | 213,9   | 175,4  | 157,9   | 116,2  | 70,5   | 78,1   | 77,1   |

|                                 |        |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |       |        |        |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| <b>álcool<br/>monoterpénico</b> | 69,7   | 62,8   | 48,3   | 76,2   | 53,0   | 81,4   | 61,4   | 70,4   | 57,1  | 58,9   | 60,4   | 56,7  | 60,7   | 69,2   |
| <b>ácidos</b>                   | 149,1  | 88,5   | 35,9   | 136,1  | 64,5   | 111,3  | 81,3   | 168,6  | 101,5 | 154,9  | 225,1  | 68,4  | 55,3   | 62,0   |
|                                 | 20,6   | 18,1   | 10,5   | 24,9   | 14,1   | 25,0   | 24,4   | 31,5   | 53,4  | 41,2   | 29,0   | 18,6  | 14,4   |        |
|                                 | 325,1  | 347,5  | 207,1  | 476,7  | 238,0  | 514,3  | 469,4  | 694,8  | 474,9 | 666,2  | 444,4  | 295,9 | 259,8  | 235,0  |
|                                 | 64,0   | 60,5   | 37,5   | 97,8   | 47,9   | 112,3  | 113,5  | 123,3  | 184,0 | 132,6  | 86,2   | 61,4  | 49,7   | 59,6   |
|                                 | 2024,3 | 1935,9 | 1116,9 | 2110,7 | 1448,1 | 2353,7 | 1940,5 | 3191,3 | 548,1 | 2208,5 | 1180,3 | 771,6 | 1395,5 | 1444,6 |
| <b>compostos<br/>carbonilo</b>  | 72,1   | 76,4   | 41,8   | 89,1   | 53,5   | 103,9  | 100,2  | 98,9   | 52,8  | 59,3   | 51,6   | 25,3  | 33,7   | 39,1   |
|                                 | 42,2   | 41,3   | 22,3   | 62,9   | 25,1   | 26,1   | 20,2   | 58,6   | 64,7  | 68,9   | 61,0   | 23,6  | 34,2   | 38,9   |
|                                 | 94,9   | 76,2   | 58,2   | 105,5  | 64,1   | 122,9  | 121,4  | 219,4  | 67,8  | 227,2  | 67,9   | 41,0  | 51,7   | 72,8   |
|                                 | 59,5   | 13,3   | 15,5   | 47,4   | 33,4   | 65,3   | 52,3   | 50,8   | 38,3  | 29,5   | 31,8   | 27,9  | 16,9   | 28,2   |

\* T0 – dia 0; T7 – dia 105; V1 - garrafa com excesso de levedura; V2 - Garrafa com Asepto (2%); V3 - garrafa com bentonite; V4 - Garrafa transparente; V5 – Garrafa verde; V6 – Garrafa armazenada a 4°C; V7 – Garrafa-padrão;



**A.5.** Figura representativa da variação da temperatura de armazenamento ao longo do tempo de experiência (120 dias).



**Figura A. 1.** Representação da variação da temperatura de armazenamento ao longo de 120 dias